

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
MICROORGANISMOS DEL ORDEN DE  
THRAUSTOCHYTRIALES PROVENIENTES DE LOS  
MANGLARES DE TUMBES”**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de  
Bióloga Genetista Biotecnológica**

**AUTOR**

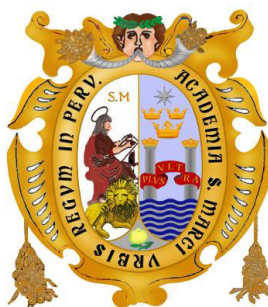
**Alejandra Katia Jiménez Espinoza**

**ASESORES**

**Rina Ramírez Mesías**

**Lima – Perú**

**2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

***AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
MICROORGANISMOS DEL ORDEN THRAUSTOCHYTRIALES  
PROVENIENTES DE LOS MANGLARES DE TUMBES***

Tesis para optar al Título profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**Bach. Alejandra Katia Jiménez Espinoza**

**Asesora: Dra. Rina Ramírez Mesías**

**Asesor externo: Luis Destefano Beltrán, PhD.**

**Lima – Perú**

**2014**

***A mis seres queridos...***

## **AGRADECIMIENTOS**

Finalizar el presente trabajo de tesis no fue nada sencillo, fue necesario el apoyo de muchas personas a quienes yo quiero y estimo muchísimo. Este espacio está dedicado a todos ellos.

En primer lugar se encuentran los dos seres más importantes de mi vida, Ana Ysabel y Luis Alberto, mis queridos padres... Simplemente GRACIAS por darme la vida, por apoyarme en la continua lucha de mi vida y por darme la oportunidad de tener una excelente educación.

Ana y Alfredo, mis preciados hermanos y a mi futuro esposo, Fabio... Gracias por ser parte de mi vida y de representar esa indescriptible FELICIDAD.

A la Dra. Rina Ramírez por haber aceptado ser mi asesora, haber confiado en mi persona, por su paciencia y que gracias a sus conocimientos, su experiencia y motivación lograron que pudiese terminar esta tesis. Al Dr. César Córdova por haber compartido sus conocimientos y ayudarme a salir de algunos atascos.

A mis amigos Ana, Max y José, que gracias a su compañía y hospitalidad en Tumbes me hicieron sentir en casa a pesar que estuve lejos de mi hogar y de mis seres queridos por un buen tiempo.

Al Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad (FIDECOM), a MARINAZUL S.A. y sobre todo a mis jefes de trabajo Yovani y Efrain quienes gracias a su apoyo, empuje y preocupación logré presentar esta **TESIS DE PREGRADO**.

Para todos ellos, simplemente GRACIAS!

## INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE BASE DE DATOS Y PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEORICO.....</b>	<b>4</b>
<i>II.1 Thraustochitridos: Clasificación, características y ocurrencia .....</i>	<i>4</i>
II.1.1 Clasificación de los Thraustochitridos .....	4
II.1.2 Características generales .....	6
II.1.3 Distribución: Hábitats y ecosistemas de su ocurrencia .....	8
<i>II.2 Aislamiento y mantenimiento de los Thraustochitridos .....</i>	<i>12</i>
II.2.1 Métodos de aislamiento .....	12
II.2.2 Mantenimiento: medios de cultivos .....	13
<i>II.3 Técnicas de identificación de Thraustochitridos.....</i>	<i>15</i>
II.3.1 Identificación bioquímica .....	15
II.3.2 Identificación molecular .....	16
<i>II.4 Thraustochitridos: fuente alternativa de AGPIs.....</i>	<i>17</i>
II.4.1 Definición e importancia de los AGPIs .....	17
II.4.2 Fuentes convencionales de AGPIs .....	20
II.4.3 Fuentes alternativas de AGPIs $\omega$ 3.....	22
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<i>III.1 Hipótesis:.....</i>	<i>25</i>

III.2	Objetivos: .....	25
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
IV.1	Área de estudio y colecta.....	26
IV.2	Aislamiento, medios de cultivo y mantenimiento de <i>Thraustochitridos</i> .....	31
IV.2.1	Metodología de la hoja senescente.....	31
IV.2.2	Metodología por cebado .....	34
IV.3	Identificación bioquímica: Tinción fluorescente.....	35
IV.4	Identificación molecular: Caracterización del gen 18S rRNA .....	36
IV.4.1	Extracción de ADN genómico.....	36
IV.4.2	PCR y secuenciamiento del gen 18S rRNA.....	36
IV.4.3	Edición y obtención de la secuencia consenso .....	38
IV.4.4	Alineamiento múltiple.....	38
IV.4.5	Caracterización de las secuencias .....	42
IV.4.6	Divergencia de las secuencias 18S rRNA .....	42
IV.4.7	Análisis filogenético molecular .....	43
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
V.1	Aislamiento y mantenimiento de cepas de <i>thraustochitridos</i> .....	45
V.1.1	Aislamiento y crecimiento .....	45
V.2	Identificación bioquímica con tinción con acriflavina y rojo de nilo .....	48
V.3	Caracterización molecular del gen 18S rRNA.....	49
V.3.1	Extracción de ADN, PCR y secuenciamiento del gen 18S rRNA.....	49
V.3.2	Ensamblaje y edición de secuencias .....	51
V.3.3	Verificación de las secuencias 18S rRNA por BLAST .....	54
V.3.4	Alineamiento múltiple.....	58
V.3.5	Divergencia en las secuencias 18S rRNA .....	59
V.3.6	Análisis filogenético .....	61

V.3.6.1. Utilizando PAUP (Métodos MP y ML) .....	61
V.3.6.2. Utilizando Mr. Bayes (Método IB) .....	61
V.3.7    Análisis de distancias genéticas entre taxa .....	64
V.3.7.1. Matriz de distancia entre géneros reportados .....	64
V.3.7.2. Matriz de distancia intraespecífica .....	64
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
VI.1 <i>Primer reporte de Thraustochitridos en los manglares de Tumbes.....</i>	<i>70</i>
VI.2 <i>Caracterización molecular de Thraustochitridos de Tumbes.....</i>	<i>72</i>
-    Sus relaciones evolutivas basadas en el marcador molecular 18S rRNA.....	72
-    Diversidad de Thraustochitridos en los Manglares de Tumbes basadas en su divergencia genética .....	74
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AG</b>	Ácido graso
<b>AGPIs</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>ALA</b>	Ácido alfa linolénico
<b>AM</b>	Agua de mar
<b>AP</b>	Agua preparada o agua de mar artificial
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>C</b>	Carbono
<b>dATP</b>	Desoxiadenosin trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidin trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosin trifosfato
<b>DHA</b>	Ácido docosahexanoico
<b>dTTP</b>	Desoxitimidin trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentanoico
<b>FIDECOM</b>	Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad
<b>GPY</b>	Medio Extracto de levadura, peptona y glicerol
<b>GRAS</b>	<i>Generally recognized as safe</i>
<b>H</b>	Medio H
<b>ICBN</b>	Código Internacional de Nomenclatura Botánica
<b>ICZN</b>	Código Internacional de Nomenclatura Zoológica



<b>INRENA</b>	Instituto Nacional de Recursos Naturales
<b>LA</b>	Ácido linoleico
<b>min</b>	Minutos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>ML</b>	Máxima verosimilitud
<b>MP</b>	Máxima parsimonia
<b>m/v</b>	Masa/volumen
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAUP</b>	<i>Phylogenetic Analysis Using Parsimony</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SCO</b>	<i>Single cells oil</i>
<b>seg</b>	Segundos
<b>TAG</b>	Triacilglicéridos
<b>Tris-HCl</b>	Buffer Tris-(hidroximetil)aminometano clorhidrato
<b>ups</b>	Unidades prácticas de salinidad
<b>ω<sub>3</sub></b>	Omega 3
<b>ω<sub>6</sub></b>	Omega 6
<b>18S rRNA</b>	Gen codifica subunidad menor ARN

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) de cadena larga a partir de los ácidos insaturados de 18 carbonos (Mataix y Sánchez de Medina, 2002).....	<b>19</b>
<b>Figura 2.</b> Salvia hispánica (izquierda). Sacha inchi (derecha arriba) y cañamones (derecha abajo).....	<b>20</b>
<b>Figura 3.</b> Algunas fuentes alternativas de AGPI $\omega$ 3. Thraustochitridos (Izquierda). Bacterias (Centro). Microalgas (Derecha).....	<b>22</b>
<b>Figura 4.</b> Muestras de agua y hojas senescentes de mangle tomadas en recipientes plásticos. ....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Mapa de ubicación de los principales Humedales del Perú, destacando ubicación de los Manglares de Tumbes.....	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Puntos de muestreo en los manglares de Tumbes representado por color el día de muestreo (ver Tabla 1). ....	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Escenarios de algunos puntos de muestreo.....	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Material utilizado en el lavado previo de las hojas de mangle .....	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Lavado con antibiótico, previo a la siembra de las hojas senescentes de mangle .....	<b>32</b>
<b>Figura 10.</b> Siembra de las hojas de mangle (Metodología de la hoja senescente) .....	<b>33</b>
<b>Figura 11.</b> Metodología por cebado con granos de polen floral .....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b> Extracción de ADN genómico de los aislados seleccionados (A) Lavado y lisis de cultivo (B) Purificación (C) y Precipitación del ADN. ....	<b>37</b>
<b>Figura 13.</b> Thraustochitridos en el contorno de la hoja de mangle (400X).....	<b>45</b>

<b>Figura 14.</b> (A) Crecimiento de los thraustochitridos en medio sólido libres de contaminación (B) Contaminación por bacterias (C) Contaminación por hongos. Visualizados por microscopía óptica (400X) .....	<b>46</b>
<b>Figura 15.</b> (A) Crecimiento de los thraustochitridos en medio sólido y (B) medio líquido visualizado por microscopio invertido (400X). .....	<b>47</b>
<b>Figura 16.</b> Thraustochitridos, protistas teñidos con acriflavina (pared celular: rojo; contenido celular: azul) visualizado por microscopio confocal (400X). .....	<b>48</b>
<b>Figura 17.</b> Thraustochitridos, protistas teñidos con rojo de nilo (interior: amarillo-oro), visualizado por microscopio confocal (400X). .....	<b>48</b>
<b>Figura 18.</b> Migración en gel de agarosa 1% de las extracciones de ADN genómico. ....	<b>49</b>
<b>Figura 19.</b> De izquierda a derecha. Carril 1: Marcador de tamaño molecular de 1000pb. Carril 2 a 16: Amplificación del gen 18S rRNA de los aislados thraustochitridos visualizados en gel de agarosa 1.5%. .....	<b>50</b>
<b>Figura 20.</b> Secuencia consenso obtenida por superposición con el programa Sequencher. ....	<b>52</b>
<b>Figura 21.</b> Ubicación de los <i>primers</i> internos en la secuencia del aislado 72. FA1 (en color amarillo, posición 37-56); RA1 (en color verde, posición 605-624); F (en color celeste, posición 387-404); R (en color rojo, posición 1254-1271); FA3 (en color fucsia, posición 1125-1144) y RA3 (en color marrón, posición 1662-1684). .....	<b>53</b>
<b>Figura 22.</b> Cromatograma mostrando la posición 1360 al 1385 aproximadamente del aislado 72, donde se identificó uno de los ruidos característicos en aislados de <i>Aurantiochytrium</i> sp. Nótese la región poliT. ....	<b>54</b>
<b>Figura 23.</b> Una de las regiones eliminadas del alineamiento múltiple por la presencia de numerosas bases degeneradas .....	<b>58</b>
<b>Figura 24.</b> Alineamiento final utilizado en los análisis filogenéticos .....	<b>59</b>

**Figura 25.** Distribución de los 56 alelos encontrados en los tres puntos de muestreo (primer día de muestreo en color celeste; segundo día, en color naranja; tercer día, en color rosado; en color plomo, alelos compartidos en los tres puntos) .....60

**Figura 26.** Árbol filogenético basado en el marcador 18S rRNA de los aislados, secuencias de *thraustochitridos* y *labirintúlidos* previamente reportadas en la base de datos. *P. micans* y *C. roenbergensis* como grupo externo. Los números en nodo muestran los valores de soporte del *bootstrap* (MP/ML), para nodos soportados por más del 50% de 1000 réplicas. ....62

**Figura 27.** Árbol filogenético generado por IB, basado en el marcador 18S rRNA de los aislados, secuencias de *thraustochitridos* y *labirintúlidos* previamente reportadas en la base de datos. *P. micans* y *C. roenbergensis* como grupo externo. La barra representa 0.06 mutaciones.....63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de los sitios y fechas en que se obtuvieron las muestras.....	<b>29</b>
<b>Tabla 2.</b> Composición del agua de mar artificial o agua preparada (AP). .....	<b>32</b>
<b>Tabla 3.</b> Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de Thraustochytridos. ....	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b> <i>Primers</i> externos e internos utilizados para obtener la secuencia del gen 18S rRNA.....	<b>38</b>
<b>Tabla 5.</b> Lista de las secuencias del gen 18S rRNA de especies relacionadas usadas en este estudio como taxa de referencia para determinar el género de los aislados.....	<b>40</b>
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis por BLAST en la base de datos del GenBank de cada uno de los 56 alelos encontrados en el presente estudio. En todos los casos correspondió al gen 18S rRNA; para cada alelo se presenta el mejor <i>hit</i> encontrado. Entre paréntesis se indica el número de cepas por alelo.....	<b>55</b>
<b>Tabla 7.</b> Divergencia de las secuencias del marcador 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies de los géneros <i>Aplanochytrium</i> , <i>Oblongichytrium</i> , <i>Sicyodochytrium</i> , <i>Ulkenia</i> , <i>Botryochytrium</i> , <i>Japonochytrium</i> , <i>Thraustochytrium</i> , <i>Schizochytrium</i> , <i>Aurantiochytrium</i> y <i>Parietichytrium</i> . ....	<b>66</b>
<b>Tabla 8.</b> Divergencia de las secuencias del marcador 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies del género <i>Aurantiochytrium</i> con secuencias de los aislados del clado <i>Aurantiochytrium</i> (Figura 26 y 27) .....	<b>67</b>
<b>Tabla 9.</b> Divergencia de las secuencias del marcador 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies de los géneros <i>Aplanochytrium</i> , <i>Oblongichytrium</i> , <i>Sicyodochytrium</i> , <i>Ulkenia</i> , <i>Botryochytrium</i> , <i>Japonochytrium</i> , <i>Thraustochytrium</i> , <i>Schizochytrium</i> , <i>Aurantiochytrium</i> y <i>Parietichytrium</i> con secuencias de género no determinado.....	<b>68</b>

<b>Tabla 10.</b> Divergencia de las secuencias del gen 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies del género <i>Parietichytrium</i> con secuencias de los aislados del clado <i>Parietichytrium</i> (Figura 26 y 27) .....	<b>69</b>
--	-----------

<b>Tabla 11.</b> Divergencia de las secuencias del gen 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies de los géneros <i>Ulkenia</i> y <i>Botryochytrium</i> con secuencias de los aislados del clado <i>Ulkenia</i> y <i>Botryochytrium</i> (Figura 26 y 27) .....	<b>69</b>
--	-----------

## LISTA DE BASE DE DATOS Y PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS

**BLAST.** - El *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) encuentra regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas contra secuencias de la base de datos y calcula la significancia estadística de las coincidencias. BLAST se puede utilizar para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a identificar miembros de familias de genes.

**ClustalX2.1.** - El programa está diseñado para (1) realizar múltiples alineamientos, (2) ver los resultados del proceso de alineamiento, y (3) si es necesario, mejorar el alineamiento.

**DNAsp.** - DnaSP, *DNA Sequence Polymorphism*, es un paquete de software para el análisis de polimorfismo de nucleótido de los datos de secuencia de ADN. DnaSP puede estimar varias medidas de variación de la secuencia de ADN dentro y entre poblaciones, así como el desequilibrio de ligamiento, la recombinación, el flujo de genes y parámetros de conversión génica.

**FigTree v.1.0.4.** - FigTree está diseñado como un visor gráfico de árboles. El programa está escrito de acuerdo a las propias necesidades del autor, por lo que, no es tan pulido y con características más completas como tendría un programa comercial.

**jModelTest.** - Este programa recientemente lanzado es una herramienta independiente utilizado para llevar a cabo la selección estadística de los modelos de mejor ajuste de sustitución de nucleótidos sin la ayuda de PAUP\*. Implementa cinco diferentes estrategias de selección de modelo: pruebas de coeficiente de probabilidad jerárquica y dinámica (hLRT y dLRT), criterio de información Akaike y el criterio de información bayesiano (AIC y BIC), y un método de Teoría de la Decisión Criterio (DT).

**MEGA 6.** - MEGA es una herramienta integrada para llevar a cabo el alineamiento de secuencias, inferencia de árboles filogenéticos, la estimación de tiempos de divergencia, el *mining* de datos en línea, la estimación de las tasas de evolución molecular, inferencia de secuencias ancestrales, y el análisis de hipótesis evolutivas. MEGA es utilizado por los biólogos en un gran número de laboratorios para la reconstrucción de la historia evolutiva de las especies y deducir la magnitud y la naturaleza de las fuerzas selectivas que determinan la evolución de los genes y las especies.

**PAUP v4.0b.** - PAUP \* es un paquete de software utilizado para la inferencia de árboles evolutivos. La influencia del análisis computacional de alta velocidad de datos moleculares, morfológicos y/o de comportamiento para inferir relaciones filogenéticas se ha expandido mucho más allá de su papel central en la biología evolutiva, ya que abarca aplicaciones en áreas tan diversas como la biología de la conservación, ecología y estudios forenses. El éxito de las versiones anteriores de PAUP: Análisis filogenético Usando Parsimonia ha hecho que sea el paquete de software más utilizado para la inferencia de árboles evolutivos.

**Mr. Bayes.** - MrBayes es un programa para la inferencia bayesiana y la elección del modelo a través de una amplia gama de modelos filogenéticos y evolutivos. MrBayes utiliza la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC), métodos para estimar la distribución posterior de los parámetros del modelo.

**Sequencher™ version 4.1.4.** - Sequencher es una herramienta de la secuenciación del ADN donde los usuarios ingresan fragmentos de secuencia. Las secuencias pueden entonces ser examinados si presentan contaminación de vector, además el programa tiene la capacidad de realizar poderosos alineamientos que permiten a los usuarios localizar y montar por superposición de secuencias de una forma rápida y sencilla.



## RESUMEN

Los Thraustochytriales o mejor conocidos como thraustochitridos son protistas pertenecientes al Grupo Chromista según los análisis del gen 18S rRNA. Considerados como una potencial fuente alternativa al aceite de pescado, estos microorganismos oleaginosos han sido aislados de diversos ambientes a nivel mundial encontrándose principalmente asociados a material vegetal en descomposición. Así, en este estudio se logró aislar cepas de thraustochitridos provenientes de todos los puntos muestreados en los manglares de Tumbes donde la caracterización bioquímica con acriflavina y rojo de nilo confirmaron su ocurrencia y los resultados de caracterización molecular permitieron determinar aislados pertenecientes a los géneros *Aurantiochytrium* (basónimo: *Shizochytrium*), *Parietichytrium*, *Botryochytrium* e *Ulkenia sensu stricto*. Asimismo se propone el posible descubrimiento de dos nuevas especies con potenciales biotecnológicos en base a información proporcionada de las características observadas en cultivo, de los análisis filogenéticos y de trabajos previos relacionadas a las cepas *Aurantiochytrium* sp. 15A-14a (*Genbank Accesion* N° AB811008) y *Schizochytrium* sp. S8 (*Genbank Accesion* N° DQ836630), los cuales dieron el mayor *hit* con los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527 y C1, respectivamente. Finalmente, el presente estudio brindó los primeros reportes de la presencia de estos thraustochitridos en nuestro país.

**Palabras claves:** Thraustochitridos, Manglares de Tumbes, método de hoja senescente y cebado, gen 18s ARNr, filogenia molecular, ácido graso poliinsaturado (AGPI).

## ABSTRACT

The Thraustochytriales or commonly known as thraustochytrids are protists belonging to the Chromista group determined by the 18S rRNA gene analysis. Considered a potential alternative source of fish oil, these oleaginous microorganisms are widely distributed in various environments around the world. Mainly, they are associated with decaying plant material. Thus, strains of thraustochytrids were isolated in this study. These strains were taken from all sampled points in the mangroves of Tumbes where biochemical characterization with acriflavine and red Nile confirmed their occurrence and the results of molecular characterization allowed determining isolates belonging to the genera *Aurantiochytrium* (basionym: *Shizochytrium*) *Parietichytrium*, *Botryochytrium* and *Ulkenia sensu stricto*. It is also proposed the possible discovery of two new species with potential biotechnological based on information provided by the characteristics observed in culture, phylogenetic analyzes and previous work related to strains *Aurantiochytrium* sp. 15A-14a (*Genbank Accesion* N° AB811008) y *Schizochytrium* sp. S8 (*Genbank Accesion* N° DQ836630), which showed the best hit along with the isolates 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527 y C1, respectively. Finally, this study provided the first reports of the presence of these thraustochitrids in our country.

**Key words:** Thraustochitrids, Tumbes's mangroves, senescent leaves and baiting method, 18S rRNA gene, molecular phylogeny, polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

## I. INTRODUCCION

En la historia de la clasificación de los Thraustochitridos, el criterio taxonómico estuvo principalmente basado en características morfológicas por lo que fueron colocados originalmente entre los hongos Phycomycetes (Sparrow, 1960) y posteriormente con los Oomycetes (Kazama, 1972, 1974). Y es sabido que la caracterización morfológica es la primera etapa en la búsqueda de nuevas cepas de microorganismos, pero debido a la plasticidad morfológica del género causada sobre todo por las condiciones de cultivo, incluso entre individuos de un mismo cultivo (Kazama, 1974; Bongiorno *et al.*, 2005), esta caracterización generalmente no es suficiente (Mo *et al.*, 2002). Por ello, la caracterización molecular, utilizada para explicar relaciones evolutivas y taxonómicas de estos microorganismos fueron mejor entendidas con los análisis del gen 18S rRNA que demostraron que los thraustochitridos son profundamente divergentes de los oomycetes y cercanos a los labirintúlidos (Cavalier-Smith *et al.*, 1994; Leipe *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2003). De esta manera, los thraustochitridos finalmente fueron designados dentro del Grupo Chromista (Heterokonta o Stramenopiles) (Cavalier-Smith, 1993; Cavalier-Smith *et al.*, 1994; Honda *et al.*, 1999).

Precisamente, dentro de estos organismos stramenopiles (Heterokonta o Chromista), los pertenecientes a la clase Labyrinthulomycetes (ICBN) o Labyrinthulea (ICZN) se caracterizan por ser microorganismos heterotróficos, de nutrición absorbente y, se distinguen de otros organismos fungoides por la presencia de zoosporas biflageladas con flagelo anterior, de una red ectoplasmática producida a partir de organelas especializadas denominadas “sagenetosomas” y de paredes celulares constituidas por escamas delgadas derivadas del aparato de Golgi (Yokoyama y Honda, 2007). En esta clase encontramos a los labirintúlidos y thraustochitridos, donde los primeros

presentan células con forma de huso que se deslizan dentro de la red ectoplasmática que las envuelve completamente y, los segundos, poseen esporangios globosos unidos al sustrato mediante un sistema rizoidal formado por delicados filamentos ramificados de la red ectoplasmática que no los rodea completamente y a su vez producen zoosporas heterocontas biflageladas (Rosa, 2006; Yokohama *et al.*, 2007).

Estos thraustochitridos han sido aislados de un amplio rango de hábitats alrededor del mundo, encontrándose incluso en manglares tropicales y subtropicales lo cual sugiere un rol ecológico como degradadores de la materia orgánica en descomposición. Por lo tanto, los manglares de nuestro país representan una gran variedad de ambientes potenciales para explorar la presencia de estos microorganismos y hacer un primer revelamiento de la biodiversidad de estos microorganismos para el Perú. Además, estos microorganismos representan fuentes valiosas de nutrientes como son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), cuya importancia y conocimiento de sus beneficios al organismo humano han sido comprendidos en los últimos años. Y junto con algunas bacterias, levaduras y microalgas productoras de lípidos han sido considerados microorganismos *Single Cell Oil* (SCO) como fuentes alternativas de AGPIs esenciales (Ratledge, 2004), superando estos al aceite del pescado, fuente convencional de AGPIs.

Finalmente, la obtención de aislados locales plantea la posibilidad de constituir un cepario con organismos disponibles tanto para estudios académicos como para la búsqueda de aislados productores de AGPIs con posibles aplicaciones biotecnológicas. Y con esta tesis se busca proponer las bases para impulsar la investigación, valorización y comercialización de microorganismos altamente productores de AGPIs, como son los thraustochitridos, lo que permitirá a nuestro país

incursionar en la faceta biotecnológica y sería considerado valioso a nivel mundial disponer de un cepario de estos microorganismos con potencial interés biotecnológico, constituyendo otro aporte más al conocimiento de nuestra biodiversidad al mundo.

## **II. MARCO TEORICO**

### **II.1 Thraustochitridos: Clasificación, características y ocurrencia**

#### **II.1.1 Clasificación de los Thraustochitridos**

Entre los investigadores, siempre ha existido una confusión respecto a la clasificación taxonómica de estos thraustochitridos y, en la historia de su clasificación, el criterio taxonómico estuvo principalmente basado en características morfológicas. Al ser típicamente microorganismos quimioorganótrofos y morfológicamente parecidos a los hongos chytridiales y oomycetes, se colocaron originalmente entre los hongos Phycomycetes (Sparrow, 1960). Recién en los inicios de 1970, estudios de microscopía electrónica de la ultraestructura de estos microorganismos determinaron su relación filogenética, descubriendo que estaban relacionados vagamente a oomycetes (Kazama, 1972, 1974). Sin embargo, sus relaciones evolutivas y taxonómicas no fueron bien entendidas sino hasta el desarrollo de métodos de secuenciación del ADN, así los análisis del gen 18S rRNA demostraron que los thraustochitridos son profundamente divergentes de los oomycetes y cercanos a los labirintúlidos (Cavalier-Smith *et al.*, 1994; Leipe *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2003). Además, los thraustochitridos difieren de los hongos de varias maneras como es la composición de sus paredes celulares, las cuales están formadas por escamas circulares derivadas del dictiosoma y dispuestas en varias capas de polisacáridos sulfatados (galactosa y mucosa) en vez de quitina y proteínas (Chamberlain y Moss, 1988; Hinzpeter, 2008). En particular, los hallazgos descritos por Honda y colaboradores (1999) revelan

que las características morfológicas utilizadas como criterio de clasificación para estos microorganismos deberían ser revaluadas.

Posteriormente, los thraustochitridos se designaron como un grupo único incluyéndose dentro del Grupo Chromista (Heterokonta o Stramenopiles) (Cavalier-Smith, 1993; Cavalier-Smith *et al.*, 1994; Honda *et al.*, 1999). Según Metz (2010), dos familias pertenecientes a este linaje Stramenopiles son Labyrinthulaceae y Thraustochytriaceae e históricamente hubo numerosas estrategias de clasificación para estos únicos organismos, frecuentemente clasificados bajo el Orden Thraustochytriales perteneciente al Phylum Heterokonta.

Por otro lado, empleando el sistema taxonómico de Anderson y Cavalier-Smith (2012), los labirintúlidos y thraustochitridos en su mayoría presentan zoosporas flageladas y juntos constituyen la Clase heterokonta Labyrinthulea, Subphylum Sagenista (Olive, 1975; Cavalier-Smith, 1986) del Phylum Bigyra, el cual se compone predominantemente de diversos flagelados fagotróficos (Cavalier-Smith, 1997; Cavalier-Smith y Chao, 2006). La clase Labyrinthulea tiene dos órdenes, Labyrinthulida (labirintúlidos) y Thraustochytrida (thraustochitridos), cada uno con una sola familia (Cavalier-Smith y Chao 2006; Porter, 1990).

Ello demuestra una vez más que en los protistas, el sistema de clasificación ha sido descifrado durante décadas, siendo descrito en paralelo por zoólogos y botánicos con nombres diferentes. Pero por razones históricas, los protistas tradicionalmente están bajo la jurisdicción del Código Internacional de

Nomenclatura Botánica (ICBN) si ellos fuesen “algas” o “hongos” y, bajo la jurisdicción del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) si ellos fuesen “protozoarios” (Adl *et al.*, 2007).

Después de numerosas revisiones, los thraustochitridos han demostrado ser una división distintiva y característica de los protistas. Hasta ahora, varios géneros han sido descritos en estos microorganismos: *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Botryochytrium*, *Diplophrys*, *Elina*, *Japonochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Ulkenia* y *Thraustochytrium* (NCBI), siendo identificadas en el último género 13 especies (Bongiorni *et al.*, 2005).

### **II.1.2 Características generales**

La clase Labyrinthulomycetes (ICBN) o Labyrinthulea (ICZN) es un grupo de los organismos Stramenopiles (=Heterokonta, Chromista), los cuales se caracterizan por ser microorganismos heterotróficos, de nutrición absorbente y, se distinguen de otros organismos fungoides por la presencia de zoosporas biflageladas con flagelo anterior, de una red ectoplasmática producida a partir de organelas especializadas denominadas “sagenetosomas” y de paredes celulares constituidas por escamas delgadas derivadas del aparato de Golgi (Yokoyama y Honda, 2007). La composición química de sus paredes es inusual, habiéndose encontrado L-galactosa, galactanos sulfatados y fucosa en diferentes especies estudiadas de *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* y *Labyrinthuloides*, respectivamente (Rosa, 2010). El resto de las organelas presentes en el citoplasma son las típicas de una célula eucariota. En cuanto



a su reproducción es básicamente asexual e involucra la formación de zoosporas a partir del clivaje progresivo de la célula vegetativa. Así las zoosporas liberadas nadan hasta encontrar un sustrato adecuado, sobre el que se fijan, y se diferencian en una célula vegetativa la cual madurará en un nuevo zoosporangio (Rosa, 2010).

Este grupo de organismos fue considerado tradicionalmente como hongos primitivos (Sparrow, 1960), y han mostrado estar emparentados con las algas heterocontas (Diatomeas, Feofíceas, etc.) y los oomycetes (Cavalier-Smith *et al.*, 1994; Dick, 2001; Kirk *et al.*, 2001). Esta clase Labyrinthulomycetes (ICBN) o Labyrinthulea (ICZN) está conformada a su vez por labirintúlidos y thraustochitridos. Por un lado, los labirintúlidos presentan células con forma de huso, que se deslizan dentro de la red ectoplasmática que las envuelve completamente; por otro lado, los thraustochitridos poseen esporangios globosos unidos al sustrato mediante un sistema rizoidal formado por delicados filamentos ramificados de la red ectoplasmática que no los rodea completamente y a su vez producen zoosporas heterocontas biflageladas (Rosa, 2006; Yokohama *et al.*, 2007).

Los thraustochitridos han sido aislados de un amplio rango de hábitats alrededor del mundo, encontrándose incluso en manglares tropicales y subtropicales lo cual sugiere un rol ecológico como degradadores de la materia orgánica en descomposición y; además, estos microorganismos representan fuentes valiosas de nutrientes como son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs).

### II.1.3 Distribución: Hábitats y ecosistemas de su ocurrencia

La presencia de thraustochitridos ha sido reportada a escala mundial (Antártida, Mar del Norte, India, Micronesia, Japón, Australia, Costa Rica, Brasil, Argentina y Chile) (Raghukumar, 1988a, 1988b, 1979; Lewis *et al.*, 1999; Ulken, 1966, 1983, 1990). Aunque tienden a concentrarse principalmente en sedimentos y en columna de agua (Raghukumar *et al.*, 2000; Raghukumar, 2002), se encuentran en una variedad de hábitats (Raghukumar, 2004; Fan *et al.*, 2002) como las superficies de algas (Booth y Miller, 1968; Haythorn *et al.*, 1980; Miller y Jones, 1983), en ambientes esturiales (Ulken, 1981), detritus marino, agua de mar (Goldstein y Belsky 1964; Bahnweg y Sparrow, 1972, 1974; Gaertner, 1981), suelos salinos (Booth, 1971) e invertebrados (Ellis y Bishop, 1989; Rosa, 2010). En este último, los thraustochitridos pueden ser parásitos en haliotis juvenil (*Haliotis kamtschatkana*) y en chirla mercenaria (*Mercenaria mercenaria*) (Bower, 1987; Maas *et al.*, 1999; Mo *et al.*, 2002; Whyte *et al.*, 1994) así como también pueden aparecer asociados por mutualismo en arrecifes de coral tales como *Favia* sp. (Siboni *et al.*, 2010) y *Fungia granulosa* (Harel *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2011).

Al hallarse asociados a material vegetal en descomposición, especialmente en algas y hojas de mangle, probablemente estos microorganismos cumplan una importante función como saprobios (Raghukumar, 2002).

Los bosques de mangle, peculiares por sus características, se encuentran distribuidos ampliamente en las regiones costeras de los trópicos y parte de

los subtrópicos. Los manglares latinoamericanos se hallan en los trópicos continentales (el norte de la costa colombiana, la desembocadura del Amazonas, regiones del suroeste brasileño, costa ecuatoriana y la costa del extremo norte del Perú).

Si bien nuestros manglares se encuentran en una zona tropical, la mayoría de los aislados reportados provienen de regiones templadas (Jones, 1976; Rosa, 2010), siendo su temperatura óptima de crecimiento entre los 25-30°C, variable según las especies utilizadas con fines de producción (Perveen *et al.*, 2006; Burja *et al.*, 2006; Yokochi *et al.*, 1998). El rango de tolerancia al pH es amplio y generalmente abarca de 4 a 9 unidades, aunque algunas especies son más sensibles a los cambios de este factor (Fan *et al.*, 2002). Los traustochitridos son primariamente marinos (Raghukumar, 2004) reportándose por Vishniac (1960) que los niveles de NaCl necesarios para que su crecimiento sea máximo son los característicos del mar (Rosa, 2010).

### ***Manglares del Perú***

Según la definición de la convención de Ramsar, los humedales son: «Extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros» (Ramsar, 1990). En cuanto a la clasificación de los humedales se puede aplicar más de una, siendo la más utilizada las propuestas por Bravo y Windevoxxel (1997), donde los manglares se situarían en la clasificación de Sistema Estuarino, definiéndose éstos como

ambientes costeros que tienen conexión con mar abierto (Charcape-Ravelo y Moutarde, 2005).

Los manglares son bosques que crecen en las aguas salobres de los estuarios fluviales. Al noroeste del Perú, los manglares se encuentran conformando pequeñas áreas (Figura 5), en comparación a los existentes en otras regiones del mundo. Clüsener (1987, apud INRENA 2007-2011) menciona que la corriente fría peruana corre paralela a la costa de sur a norte hasta los 6º Latitud Sur impidiendo el desarrollo de manglares en la costa peruana más al sur de esta latitud. Sin embargo, la ausencia de manglares entre los 3º35' y los 6º Latitud Sur se explica por factores de naturaleza climática como edáfica, según el autor. El ecosistema manglar se localiza en la región Tumbes, en el litoral que va desde los 3º 24' Latitud Sur (frontera con el Ecuador, Canal Internacional y Punta de Capones) hasta los 3º 35' Latitud Sur (Playa Hermosa), y desde los 80º13'08" hasta los 80º31'03" Longitud Oeste (INRENA, 2007-2011). Estos complejos boscosos presentan una biota característica constituida por especies de mangle de los géneros *Rhizophora*, *Avicennia*, *Laguncularia* y *Conocarpus*; se distribuyen desde Tumbes, límite con el Ecuador, hasta San Pedro (Vice-Sechura, Piura) (Charcape-Ravelo y Moutarde, 2005).

Ecológicamente los manglares representan un ecosistema transitorio entre ambientes marino y costero continental donde el nivel de agua fluctúa mucho de acuerdo con las mareas. Los bosques de mangle requieren aguas templadas y resisten diferentes grados de salinidad, sólo la flora y fauna con tolerancia fisiológica a los cambios permanentes pueden sobrevivir en este

ambiente. El clima, la naturaleza del sustrato, así como la estructura, propiedades físicas, composición química, salinidad, acidez del suelo y los sedimentos determinan el desarrollo, crecimiento y productividad de los ecosistemas de manglar, características que los hacen únicos en el mundo (INRENA, 2007-2011).

La fauna es muy diversa, desde organismos microscópicos, los menos conocidos, hasta todos los grupos de vertebrados, a excepción de los anfibios, que no tienen representante dentro de este sistema natural (INRENA, 2007-2011). La fauna endémica lo constituyen la concha negra *Anadara* spp.; los cangrejos violinistas *Uca* spp.; el cangrejo gigante *Ucides* spp.; caracoles *Cerithidea* y *Nassarius*; el caracol coco *Melongena patula*; las ostras *Ostrea* spp. (Charcape-Ravelo y Moutarde, 2005).

Dentro de los ecosistemas relacionados con los ambientes marinos, los manglares ocupan el segundo lugar en producción de biomasa y energía, después de los arrecifes de coral. Su gran diversidad se debe a la interacción de las aguas dulce y salada que convergen para formar los estuarios (Charcape-Ravelo y Moutarde, 2005), y los manglares de Tumbes no escapan a ello.

## **II.2 Aislamiento y mantenimiento de los Thraustochitridos**

### **II.2.1 Métodos de aislamiento**

Los métodos del cebado y del sembrado directo son los recomendados para el aislamiento de cepas de thraustochitridos. El método de cebado por polen es el procedimiento comúnmente usado, el cual utiliza granos de polen esterilizados y dispersados en la muestra de agua con agentes antifúngicos y antibióticos e incubados por 1 a 2 semanas. Después de ser colonizados, los cebos con estos microorganismos son sembrados en medio agarizado, donde desarrollan nuevas colonias que luego son transferidas sucesivamente hasta obtener cultivos puros (Porter, 1990). Pero, reportes previos mencionan que algunos thraustochitridos no prosperan sobre el polen y se debe aplicar otros cebos, como en el caso de *Ulkenia amoeboides*, requiere de *Artemia salina* estériles (Bahnweg y Sparrow, 1974).

Por otro lado, la metodología propuesta por Watson y Ordal (1957), consta básicamente en la siembra directa de material en descomposición (hojas senescentes) en medio sólido, debido a la particularidad de estos microorganismos de hallarse asociados a material vegetal en esas condiciones, especialmente en algas y hojas de mangle cumpliendo probablemente una importante función como saprobios.

## II.2.2 Mantenimiento: medios de cultivos

Los primeros esfuerzos por obtener cultivos puros corresponden a S. W. Watson y H. S. Vishniac, quienes formularon varios medios de cultivo para *Labyrinthula* (Vishniac y Watson, 1953; Vishniac, 1955). En 1957, Watson y Ordal sembraron material (hojas con el patógeno) en un medio sólido conteniendo 0.9 % m/v de agar y 10 % v/v de suero de caballo y posteriores transferencias permitieron obtener el primer cultivo puro de *Labyrinthula*. A este medio de cultivo lo denominaron SSA (*Serum Seawater Agar*) y verificaron que también era efectivo para el crecimiento de una cepa de *Thraustochytrium*. Por su parte Vishniac (1956) formuló otro medio de cultivo para poder desarrollar estudios ecológicos. Dicho medio contenía glucosa (0.1% m/v), hidrolizado de gelatina (0.1% m/v), extracto de hígado (0.02% m/v), una solución de vitaminas del grupo B y agar (1.5% m/v) en agua de mar. Y según dicho estudio, la siembra de muestras de agua de mar sobre el mismo permitió el aislamiento de un importante número de colonias de hongos zoospóricos, entre ellos Thraustochytriales (considerados como hongos inicialmente). Años más tarde, Fuller y colaboradores (1964) modificaron este medio, algunos ajustes en las concentraciones de los componentes y el reemplazo de la solución de vitaminas del grupo B por extracto de levadura y lo denominaron “Medio Vishniac Modificado” o KMV (Rosa, 2010).

A partir del interés que los Thraustochytriales han adquirido como productores de AG  $\omega$ 3, varios grupos de investigación se abocaron al aislamiento de cepas de estos microorganismos y para ello implementaron sus propios medios de cultivo y los más adoptados son GPY y H (Honda *et al.*, 1998).

La fuente de carbono más utilizada en los medios de cultivo para *thraustochitridos* es la glucosa, aunque estos microorganismos pueden utilizar un amplio rango de fuentes de carbono (C) así como de nitrógeno (N) para su crecimiento (Goldstein, 1963). En los últimos años se han evaluado diferentes fuentes de C y N para la producción de AG  $\omega$ 3. Entre las principales fuentes de C utilizadas tenemos a la glucosa, maltosa, glicerol crudo, residuos de cerveza, etc. Por otro lado, entre las fuentes de N, tenemos a la peptona, triptona, extracto de levadura, extracto de malta, etc. (Gupta *et al.*, 2012).

Antibióticos tales como penicilina y estreptomicina (Burja *et al.*, 2006; Quilodrán *et al.*, 2010), y rifampicina y antifúngico tales como nistatina (Jakobsen *et al.*, 2007; Wilkens y Maas, 2012) y anfotericina B (Taoka *et al.*, 2010) han sido usados en medios sólidos y líquidos para minimizar el crecimiento de bacterias y hongos (Gupta *et al.*, 2012).



## **II.3 Técnicas de identificación de Thraustochitridos**

Técnicas bioquímicas y moleculares han sido usadas recientemente para identificar nuevos aislados de microorganismos marinos (Gupta *et al.*, 2012). Procedimientos de tinción usando fluorocromos para detección directa basada en características morfológicas de los microorganismos han sido empleados (Raghukumar y Schaumann, 1993). Identificación a nivel de especie está basada en el secuenciamiento del gen 18S rRNA y a su vez estas secuencias obtenidas son alineadas con secuencias de thraustochitridos disponibles para establecer la relación evolutiva entre los aislados y las cepas reportadas en la base de datos llevando a la identificación de los aislados.

### **II.3.1 Identificación bioquímica**

Si bien la caracterización morfológica es la primera etapa en la búsqueda de nuevas cepas con estos microorganismos, debido a la plasticidad morfológica del género causada sobre todo por las condiciones de cultivo, incluso entre individuos de un mismo cultivo (Kazama, 1974; Bongiorno *et al.*, 2005), esta caracterización generalmente no es suficiente (Mo *et al.*, 2002). Por ello, una técnica rápida de detección directa del microorganismo utiliza microscopía de epifluorescencia y acriflavina, que involucra la reacción entre el fluorocromo (acriflavina), la pared celular sulfatada y su núcleo (Raghukumar y Schaumann, 1993). La pared celular fluoresce de color rojo y el núcleo azul-verde (Naganuma *et al.*, 1998), diferenciándose de otros protistas que sólo fluorescen verde.

### **II.3.2 Identificación molecular**

Por otro lado, la caracterización molecular, utilizada para explicar relaciones evolutivas y taxonómicas de estos microorganismos, es una técnica que puede ayudar en la identificación y clasificación de nuevas cepas. El gen que codifica la subunidad menor ribosomal RNA (18S rRNA) es el estándar utilizado para este propósito. En la búsqueda de cepas productoras de ácidos grasos poliinsaturados como el DHA, el perfil de ácidos grasos es la característica más importante y se ha comprobado que este perfil permite agrupar a estos microorganismos con una aproximación muy cercana a la que se obtiene en términos de su secuencia 18S rRNA (Huang *et al.*, 2003).

## **II.4 Thraustochitridos: fuente alternativa de AGPIs**

### **II.4.1 Definición e importancia de los AGPIs**

Los ácidos grasos (AG), constituyentes de los triacilgliceroles (TAG), son necesarios para todos los seres vivos, pues son fundamentales para su crecimiento, desarrollo y reproducción. Éstos pueden ser saturados, cuando los átomos de carbono se unen a través de enlaces simples, e insaturados, si existen uno o más dobles enlaces, denominándose estos últimos AG poliinsaturados (AGPI). Estos AGPIs contienen sus enlaces dobles en una cadena de ácido graso de 18 o más átomos de carbono siendo dos de ellos esenciales en la nutrición de animales y del ser humano, el ácido linoleico (C18:2  $\omega$ 6, LA) y ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3  $\omega$ 3, ALA). Estos ácidos son precursores de la síntesis de otros AG de cadena larga y sólo son sintetizados por vegetales; de ellos derivan las familias omega 3 ( $\omega$ 3) y omega 6 ( $\omega$ 6) (Figura 1) (Mataix y Sánchez de Medina, 2002).

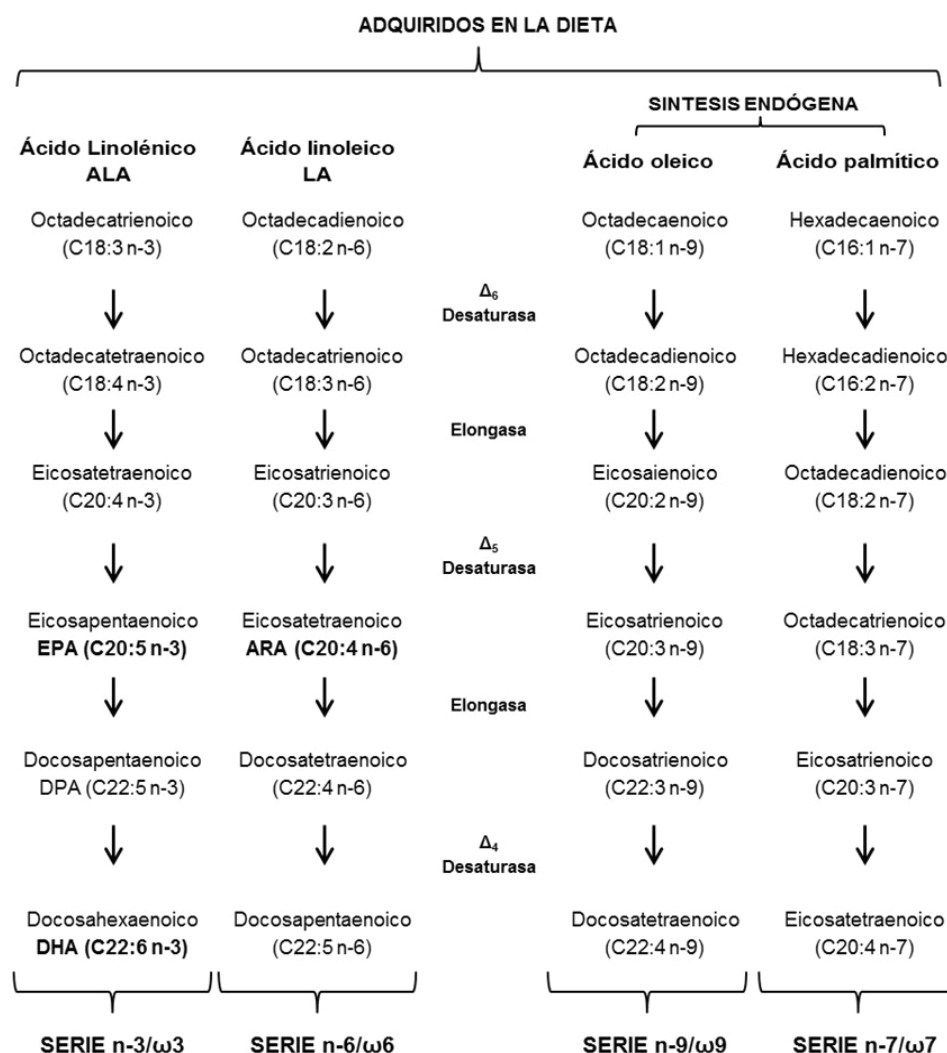
Estos AGPIs son constituyentes importantes de las membranas celulares y forman parte de los sistemas de señales celulares y su deficiencia puede asociarse a defectos en la función celular y eventualmente puede conducir a la muerte. Durante la década de 1980 y principios de 1990, se hizo evidente su creciente interés tanto en el desarrollo de recién nacidos como en la prevención y tratamiento de una variedad de enfermedades como la arteriosclerosis, artritis, algunos tipos de cáncer y por disminuir la incidencia de enfermedades coronarias y cardiovasculares en general (Masson *et al.*, 2007; Russo, 2009). En particular los AGPIs de cadena larga de la serie  $\omega$ 3

(Figura 1) se encuentran casi de manera única en los peces y mariscos, así el ácido eicosapentanoico (C20:5, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6, DHA), han sido objeto de diversas investigaciones debido a sus efectos beneficiosos. Dada nuestra limitada capacidad de transformar el ALA en EPA y casi nada de DHA lo que origina un dilema, el cuerpo necesita el DHA para la estructura y funcionamiento del cerebro y de la retina del ojo, se estableció entonces que era “fisiológicamente esencial” tanto en el desarrollo cerebral y visual en infantes, así como por sus efectos positivos reportados en adultos. Y el EPA es importante para tener vasos sanguíneos saludables, para la salud del corazón y funcionamiento del cerebro. Además, tiene también propiedades antiinflamatorias y anticoagulantes.

Por otro lado, los ácidos grasos  $\omega 6$  también son esenciales, pero tienden a consumirse en exceso en las dietas modernas occidentales y se estima que la relación  $\omega 6/\omega 3$  en la dieta de estas poblaciones se encuentra en el rango de 11:1 a 20:1. Esta relación es significativamente diferente de los valores recomendados 1:1 a 4:1 correspondientes a la proporción encontrada en la leche materna (Saglik y Imre, 2001; Mataix, 2002; Hinzpeter, 2008); por lo que, una proporción alta  $\omega 6/\omega 3$  ha sido implicada en incidencia de enfermedades cardiovasculares (Lee y Lip, 2003), cáncer (Roynette *et al.*, 2004), diabetes (Seo *et al.*, 2005), enfermedades inflamatorias (Nagel *et al.*, 2003), y desórdenes neuropsiquiátricos (Reddy y Yao, 2003).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado adicionar DHA en las fórmulas de leche materna para asegurar el desarrollo del cerebro y la visión en los infantes en el año 1975; en el año 1995 y 1996 un panel de

expertos en EEUU concluyó que los suplementos con ARA (de *Mortierella alpina*) y DHA (de *Crypthecodinium cohnii*) podían ser considerados como GRAS (Generally recognized as safe) para el uso de infantes y adultos (Ward y Singh, 2005).



**Figura 1. Formación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) de cadena larga a partir de los ácidos insaturados de 18 carbonos (Mataix y Sánchez de Medina, 2002)**

## II.4.2 Fuentes convencionales de AGPIs

En el mundo vegetal, las semillas de la chía o salvia hispánica poseen la concentración más alta de  $\omega 3$  conocida hasta ahora (58-65% ALA). Otras alternativas son las semillas de lino, los cañamones, las nueces y la sacha inchi, una variedad de maní de origen amazónico que se encuentra principalmente en el Perú (48%  $\omega 3$ ), pero tanto EPA como DHA no están presentes en los vegetales superiores. Así, los AGPI  $\omega 6$  como el LA se encuentran en semillas de cártamo, girasol, poroto de soja, maíz y ajonjolí; el ácido araquidónico (ARA) se encuentra en carnes animales, huevos y leche.



**Figura 2. Salvia hispánica (izquierda). Sacha inchi (derecha arriba) y cañamones (derecha abajo)**

Obtenido de <http://amicomario.blogspot.com/2012/09/la-salvia-hispanica-comunemente-nota.html>, <http://proyectosachainchi.galeon.com/>, <http://www.vitonica.com/alimentos-funcionales/semillas-de-canamo-beneficios-para-el-organismo>, respectivamente.

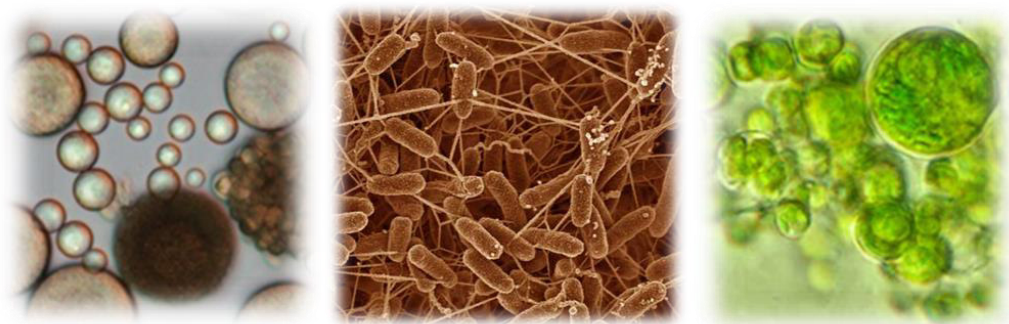
Por otro lado, la fuente convencional de AGPIs  $\omega 3$  es principalmente el aceite proveniente de peces de agua fría como el bacalao, salmón, sardina, caballa, lacha, anchoa, atún, etc. (Medina *et al.*, 1998).

Notablemente, los peces como los seres humanos, no somos capaces de sintetizar AGPI *de novo*. Así, estos organismos marinos lo obtienen de vegetales inferiores que integran el fitoplancton así como de bacterias autotróficas marinas y protozoos componentes del zooplancton (Iwamoto y Sato, 1986), constituyendo el fitoplancton la mayor fuente alimentaria de los herbívoros filtradores marinos y el principal portador de los precursores: LA y ALA. De esta manera, los peces pueden concentrar tanto EPA como DHA en su tejido adiposo, grasa muscular, vísceras y gónadas en forma de TAG. La composición y cantidad de AGPI  $\omega 3$  en los aceites de pescado dependerá de la especie, de la época del año y lugar geográfico donde se capture (Hinzpeter, 2008).

Debido a que el aceite de pescado puede proveer una mezcla de AGPIs, esta mezcla compleja de AG varía tanto en longitudes de cadena como grado de insaturación, lo cual requiere de unos extensos y costosos pasos de refinación y purificación para producir un producto nutracéutico o farmacéutico conveniente (Belarbi *et al.*, 2000). Por otro lado, las poblaciones de peces marinos están sujetas a variaciones estacionales y climáticas (Gill y Valivety, 1997), sobrepesca, etc., que conllevan a una disminución de sus poblaciones (Caddy y Garibaldi, 2000) y, como tal, no pueden proporcionar un suministro constante ante la creciente demanda del mercado. Es sabido que en los últimos años se ha dado bastante énfasis en el consumo de estas fuentes de AGPIs  $\omega 3$  (por los beneficios que aportan en su consumo), pero en un futuro se estima que será insuficiente satisfacer esta creciente demanda mundial conllevando a buscar nuevas fuentes alternativas de estos AGPIs.

### II.4.3 Fuentes alternativas de AGPIs $\omega 3$

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de diferentes recursos con alto contenido de AG  $\omega 3$ . Se ha indicado que la principal fuente se encuentra en peces y mariscos. Sin embargo, éstos no son capaces de sintetizar *de novo*, y los adquieren a través del alimento proveniente de la cadena trófica (Hinzpeter, 2008). Microorganismos marinos tales como algas, hongos, bacterias y ciertas especies de thraustochitridos pueden acumular aceites bajo condiciones particulares de cultivo. Estos aceites microbianos (SCO: *Single Cell Oil*) son definidos como aceites comestibles obtenidos de microorganismos que pueden ser similares en tipo y composición a los obtenidos de plantas y animales (Ratledge, 2005). En comparación con el uso de aceites vegetales, los aceites microbianos ofrecen muchas ventajas: los microorganismos tienen un ciclo de vida corto, pueden ser fácilmente manipulados en comparación con las plantas; se ven menos afectados por localización, temporada, y el clima como sucede en las plantas, y la producción de aceites está sujeta a gran escala (Hong *et al.*, 2011).



**Figura 3. Algunas fuentes alternativas de AGPI  $\omega 3$ . Thraustochitridos (Izquierda). Bacterias (Centro). Microalgas (Derecha)**

Obtenido de: <http://www.csiro.au/Organisation-Structure/National-Facilities/Australian-National-Algae-Culture-Collection/Bioapplications-of-algae.aspx>, <http://www.afinidadelectrica.com.ar/articulo.php?IdArticulo=136> y <http://wood-pellet-ireland.blogspot.com/2011/07/algae-pre-historic-and-furure-oil.html>, respectivamente.



Actualmente estos SCO son ampliamente aceptados en el mercado y su producción se está expandiendo y diversificando cada día. Los esfuerzos realizados en los últimos años se han dirigido hacia el desarrollo de tecnologías como el avance de la biología molecular y las técnicas de ADN recombinante que ayudan al desarrollo y optimización de estos procesos de producción a nivel comercial (Hinzpeter, 2008).

Entre los microorganismos capaces de producir aceites microbianos encontramos a las bacterias, donde algunas especies (*Shewanella*, *Colwellia* y *Moritella*) tienen la capacidad de producir solamente un AG, a diferencia de la compleja mezcla producida por microalgas o acumulada en los peces (Russell y Nichols, 1999). La desventaja radica en sus concentraciones lipídicas bajas (Nichols y McMeekin, 2002), su contenido inusual de otros lípidos y que requieren condiciones de cultivo dificultosas, por lo que, no son consideradas como sistemas adecuados con fines productivos (Ratledge y Wynn, 2001).

Entre los hongos, el género *Mortierella* destaca por ser una promisoría fuente de aceites microbianos rica en varios tipos de AGPIs C20, pero su producción es 1 ó 2 veces menor a la producción obtenida por algas.

Otra fuente alternativa son las microalgas, microorganismos diversos que incluyen al fitoplancton. Ellas constituyen un reservorio de compuestos bioactivos (AG, pigmentos y vitaminas). En la producción de AG destacan los géneros *Porphyridium*, *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, y el dinoflagelado marino *Cryptocodinium cohnii*, cuyos aceites resultantes están libres del olor y sabor característico del aceite de pescado. Sin embargo, el principal obstáculo

para la producción comercial de algas se debe a que la mayor parte de ellas son fotoautótrofas obligadas y además no acumulan los AGPIs como triacilglicerol relacionados principalmente por la limitación de luz y la acumulación de oxígeno (Barbosa, 2003). Y la alternativa a los fotobioreactores es utilizar algas con capacidad de crecer heterotróficamente en fermentadores convencionales.

A diferencia de éstos, los cultivos heterotróficos de thraustochitridos presentan altas concentraciones de AGPI  $\omega_3$ , especialmente DHA y, varias cepas son capaces de producir un único AGPI, lo que ha despertado recientemente un particular interés biotecnológico por su importancia en la salud humana y en la acuicultura (Lewis *et al.*, 1999), y además considerados como potenciales candidatos para muchas otras aplicaciones por producir ciertos metabolitos secundarios (Fan y Chen, 2007). Diversos estudios han demostrado la capacidad de algunas cepas de thraustochitridos, principalmente los géneros *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*, por producir gran cantidad de biomasa y lípidos con alta proporción de AGPI (Bowles *et al.*, 1999). En general, estos microorganismos son capaces de acumular más del 50% de su peso seco como lípidos, del cual más del 25% es normalmente DHA, almacenándose en las paredes y membranas celulares como material de reserva en forma de TAG (Nichols y McMeekin, 2002).

Actualmente los microorganismos marinos heterótrofos que son utilizados en procesos comerciales para la producción de AGPIs  $\omega_3$ , particularmente DHA, son el dinoflagelado marino *Cryptothecodinium cohnii* y los géneros de thraustochitridos, *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* (Ward y Singh, 2005).

### **III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### **III.1 Hipótesis:**

Los microorganismos eucariontes pertenecientes al Orden Thraustochytriales se encuentran en diversos ambientes esturiales y salinos por lo que es posible encontrar cepas de estos microorganismos productores de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) en los manglares de Tumbes.

#### **III.2 Objetivos:**

##### ***General:***

- Caracterizar molecularmente microorganismos del orden Thraustochytriales obtenidos de los manglares de Tumbes con capacidad de crecimiento heterotrófico en cultivo.

##### ***Específicos:***

- Aislar cepas de thraustochitridos a partir de muestras colectadas en los manglares de Tumbes.
- Corroborar su capacidad de producción de ácidos grasos poliinsaturados mediante la detección de cuerpos lipídicos en su citoplasma.
- Caracterizar molecularmente las cepas de thraustochitridos para el reconocimiento de género y/o especie.

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS

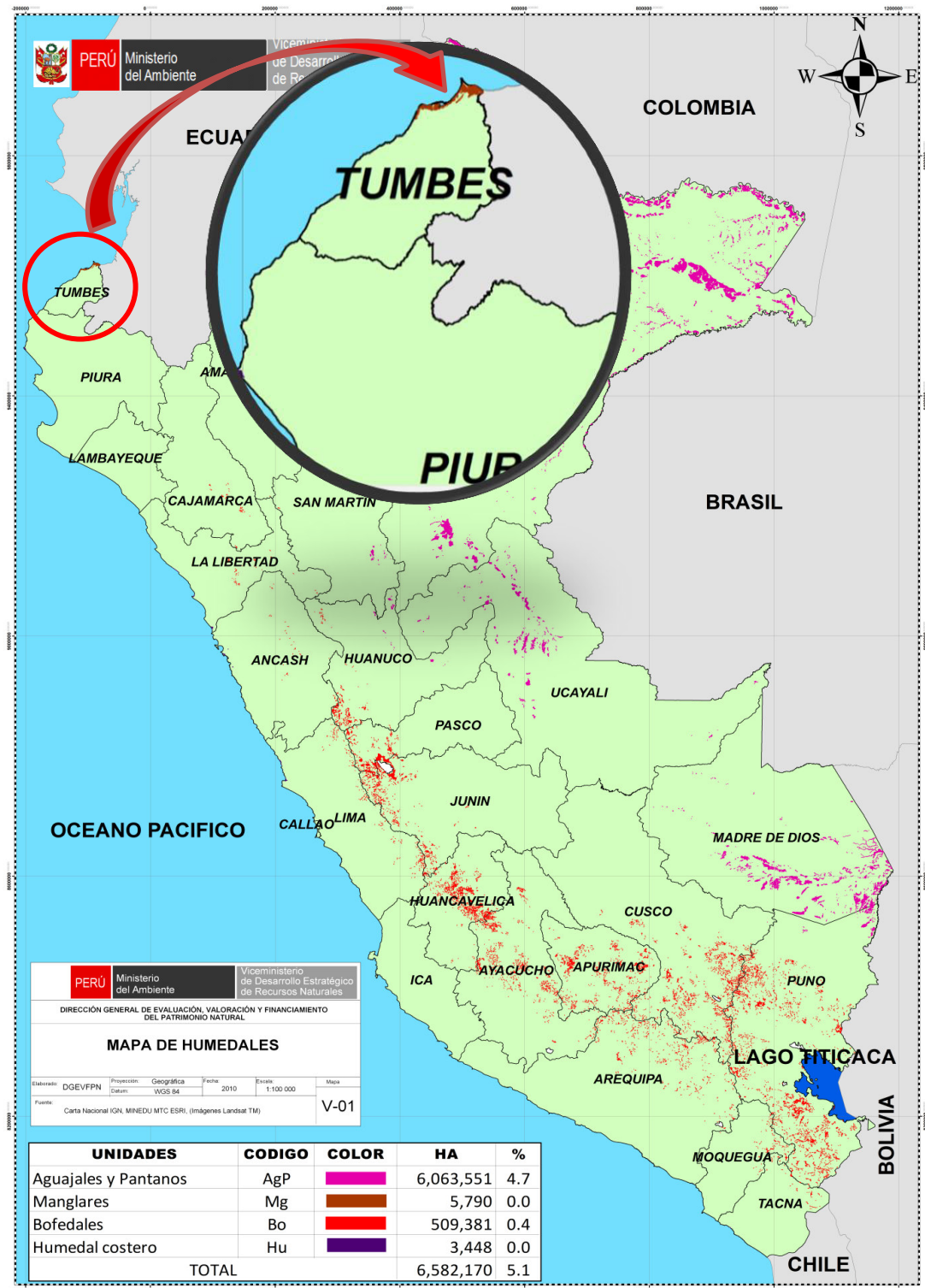
La presente tesis estuvo subvencionada por un proyecto FIDECOM, el cual se desarrolló en las instalaciones del centro de Investigación BIOTEC C.M.C – MARINAZUL S.A. del Grupo D&C, en la ciudad de Tumbes. Estos proyectos involucran la asociación Empresa-Universidad, y es así que esta tesis, uno de los componentes del proyecto de BIOTEC, fue supervisada por el Dr. Luis Destefano de la UPCH, quien para la UNMSM representa mi asesor externo.

##### IV.1 Área de estudio y colecta

Las muestras de agua y hojas senescentes de mangle fueron tomadas en recipientes plásticos estériles de 100mL (Figura 4), utilizando uno por punto muestreado en los Manglares de Tumbes (Figuras 5, 6 y 7). En cada uno de los puntos se midieron los valores de salinidad, temperatura y pH. Las salinidades se estimaron con un refractómetro RHS-10 (Huake Instrument Co., China), el cual detectó valores de 10 a 33‰ (Tabla 1).



**Figura 4. Muestras de agua y hojas senescentes de mangle tomadas en recipientes plásticos**



**Figura 5. Mapa de ubicación de los principales Humedales del Perú, destacando ubicación de los Manglares de Tumbes**



**Figura 6. Puntos de muestreo en los manglares de Tumbes representado por color el día de muestreo (ver Tabla 1)**



**Figura 7. Escenarios de algunos puntos de muestreo**

**Tabla 1. Descripción de los sitios y fechas en que se obtuvieron las muestras**

Recolección	Fecha	Datos del sitio					N° cepas obtenidas
		Zona	Coordenadas	Temperatura	Salinidad	pH	
1	13/06/2012	Estación 1-Puerto 25/ Final del camino	-	27	27	8	5
2	13/06/2012	Estación 2-Puerto 25/ Camino intermedio	Latitud 3°27'15.55''S Longitud 80°16'17.72''O Altitud 30 pies	27	26	7.5	11
3	13/06/2012	Estación 3-Puerto 25	-	26.9	26	7.5	11
4	13/06/2012	Estación 1-Algarrobo	Latitud 3°27'05.07''S Longitud 80°16'30.45''O Altitud 33 pies	27.5	27	7.5	11
5	13/06/2012	Estación 4-Campamento Puerto 25	Latitud 3°27'23.23''S Longitud 80°16'14.57''O Altitud 56 pies	27.4	24	7.5	6
6	13/06/2012	Estación 2-Campo Paracas/Algarrobo	Latitud 3°27'20.22''S Longitud 80°16'51.42''O Altitud 56 pies	27.5	26	7.5	8
7	13/06/2012	Estación 1-Estación de bombeoParacas	-	28	24	8	6
8	13/06/2012	Estación 1-El Bendito/playa	Latitud 3°25'54.83''S Longitud 80°19'20.88''O Altitud 62 pies	27.3	30	7.5	10
9	13/06/2012	Estación 2-El Bendito/pueblo	Latitud 3°27'02.71''S Longitud 80°19'03.09''O Altitud 43 pies	26.1	30	8	10
10	13/06/2012	Estación 3-Entrada al SERNANP	Latitud 3°28'13.62''S Longitud 80°17'53.30''O Altitud 53 pies	28	25	8	7
11	14/06/2012	Estación 1-Jeli	Latitud 3°29'43.37''S Longitud 80°22'30.96''O Altitud 20 pies	26.5	30	7.5	7
12	14/06/2012	Estación 2-Langostinera Slava/Jeli	-	26.4	30	7.5	7
13	14/06/2012	Estación 3-Camino a Jeli	Latitud 3°30'4''S Longitud 80°22'27''W Altitud 30 pies	25.5	30	7	15
14	14/06/2012	Estación 1-Puerto Pizarro/La Ramada	Latitud 3°30'10.22''S Longitud 80°23'50.64''O Altitud -13 pies	25.4	28	7.5	9
15	14/06/2012	Estación 2-Puerto Pizarro/La Ramada	Latitud 3°30'14.03''S Longitud 80°23'49.77''O Altitud - 13 pies	25.7	28	7	10



**Continuación de la Tabla 1...**

Recolección	Fecha	Datos del sitio					N° cepas obtenidas
		Zona	Coordenadas	Temperatura	Salinidad	pH	
16	14/06/2012	Estación 4-Pizarro/Jeli	Latitud 3°29'47.50''S Longitud 80°22'57.32''O Altitud 23 pies	25.6	29	7	7
17	14/06/2012	Estación 3-La Ramada	-	26.4	28	7	10
18	14/06/2012	Estación 1-El Mocho	Latitud 3°30'57.30''S Longitud 80°25'34.84''O Altitud 108 pies	26.5	28	7.5	7
19	14/06/2012	Estación 2-El Mocho	Latitud 3°30'47.94''S Longitud 80°25'37.18''O Altitud 39 pies	26.4	26	7	10
20	14/06/2012	Estación 4-Langostinera Camarones-La Ramada	Latitud 3°31'26.90''S Longitud 80°25'56.64''O Altitud 52 pies	27.8	28	8	6
21	14/06/2012	Langostinera Las Palmeras	Latitud 3°30'19.48''S Longitud 80°26'20.44''O Altitud 20 pies	27.6	12.5	7.5	9
22	14/06/2012	Langostinera Las Palmeras (2)	-	25.9	17	7.5	8
23	05/07/2012	Estación 5-estación de bombeo Langostinera Mar Norte	Latitud 3°30'56.40''S Longitud 80°30'20.91''O Altitud 56 pies	26.2	32	7	8
24	05/07/2012	Estación 4- cerca de boca de playa	Latitud 3°31'29.96''S Longitud 80°30'27.36''O Altitud 252 pies	25.8	33	7.5	8
25	05/07/2012	Estación 1-Embarque Rodas	Latitud 3°30'39.79''S Longitud 80°30'01.15''O Altitud 417 pies	25.9	32	7.5	14
26	05/07/2012	Estación 2-Dren Canela	Latitud 3°30'23.56''S Longitud 80°29'48.98''O Altitud 226 pies	26.2	30	7	15
27	05/07/2012	Estación 3-Estación de bombeo Rodas	Latitud 3°31'37.96''S Longitud 80°30'30.98''O Altitud 227 pies	26	32	8	9
28	05/07/2012	Estación 1-Estero La Chepa (1)	Latitud 3°34'37.62''S Longitud 80°31'57.96''O Altitud 59 pies	25.8	30	7	8
29	05/07/2012	Estación 2-Estero La Chepa (2)	Latitud 3°34'38.88''S Longitud 80°31'56.21''O Altitud 176 pies	26.2	30	7	9
30	05/07/2012	Estación 3-Dren Piojo	Latitud 3°34'23.79''S Longitud 80°31'49.65''O Altitud 46 pies	28.6	10	7	7
N° total de aislados							268



## IV.2 Aislamiento, medios de cultivo y mantenimiento de Thraustochytridos

A continuación se describe las dos metodologías empleadas en los aislamientos de estos microorganismos:

### IV.2.1 Metodología de la hoja senescente

El mismo día del muestreo, el material colectado se dispuso en placas Petri empleando la metodología propuesta por Watson y Ordal (1957).

El procedimiento inicial consistió en el lavado previo de las hojas con agua de mar con antibiótico (0.001g/mL) (Figura 8 y 9) y su posterior sembrado en placas con medio agarizado (Figura 10). Agua de mar (AM) y agua de mar artificial o agua preparada (AP) al 15% y 70% (Tabla 2) fueron utilizadas en la elaboración del medio agarizado o sólido [extracto de levadura  $1\text{ g L}^{-1}$ , peptona  $1\text{ g L}^{-1}$ , y agar  $13\text{ g L}^{-1}$ ], suplementado con estreptomicina y ampicilina ( $30\text{ mg L}^{-1}$  de cada uno) para eliminar la flora bacteriana (Tabla 3).



**Figura 8.**  
**Material utilizado en el lavado previo de las hojas de mangle**

**Figura 9.**  
Lavado con antibiótico, previo a la siembra de las hojas senescentes de mangle

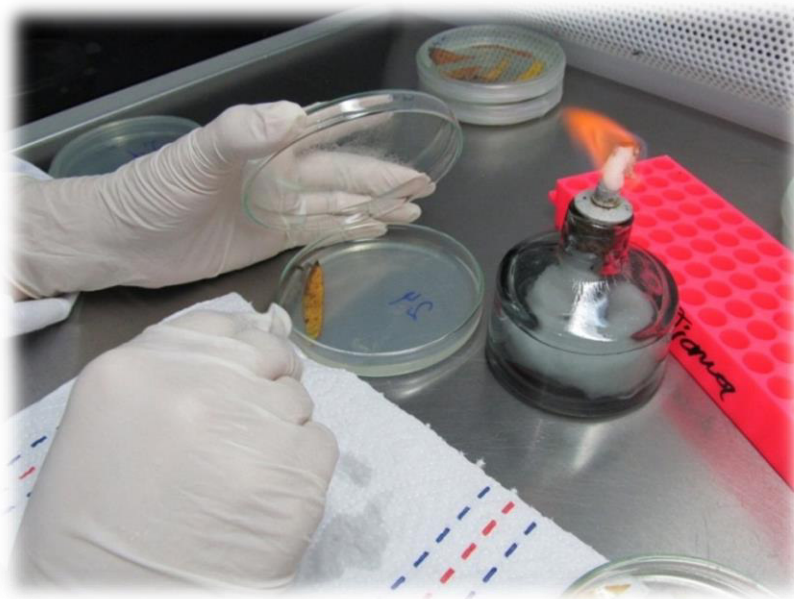


**Tabla 2. Composición del agua de mar artificial o agua preparada (AP)**

Componentes	Composición del agua de mar artificial (g/L)
Carbonato de sodio	0.2
sulfato de magnesio	6.78
cloruro de magnesio	5.38
cloruro de potasio	0.72
cloruro de sodio	27.5
cloruro de calcio	1.4

**Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de Thraustochitridos**

Componentes	Composición del medio (g/L)	
	Agar	Caldo YPG
Extracto de levadura	1	2
Agua peptona	1	2
Agar	13	-
Glucosa	-	10
Estreptomicina	0.3	0.15
Ampicilina	0.3	0.15

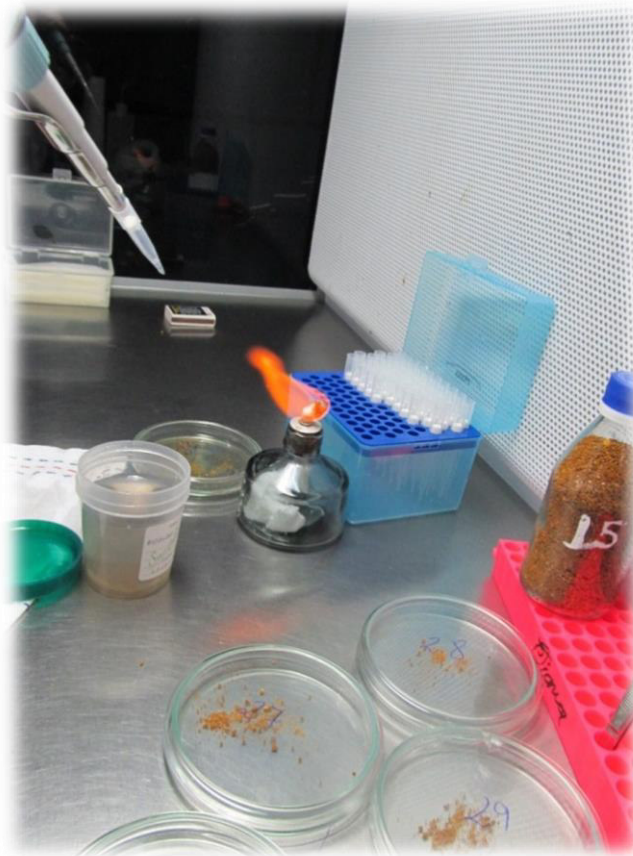


**Figura 10.**  
**Siembra de las**  
**hojas de mangle**  
**(Metodología de la**  
**hoja senescente)**

Cada una de las muestras colectadas de los diferentes puntos de muestreo se sembraron en 4 medios sólidos diferentes: AM15%, AM70%, AP15% y AP70%, para evaluar el crecimiento de los thraustochitridos. Las primeras colonias individuales de thraustochitridos obtenidas fueron transferidas sucesivamente a los mismos medios iniciales (AM15%, AM70%, AP15% y AP70%) hasta obtener cultivos puros, libres de microorganismos contaminantes como hongos, bacterias y levaduras.

#### IV.2.2 Metodología por cebado

Por otro lado, no solo se utilizó la metodología de la hoja senescente. Se colocó aproximadamente 7 mL de muestra de agua, colectada en cada uno de los diferentes puntos de muestreo, en placas Petri con granos de polen floral como cebos (Figura 11). Una vez que los cebos fueron colonizados, se transfirieron a medio agarizado suplementado con antibióticos en la concentración indicada anteriormente ( $30 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno). Los cebos con thraustochitridos sembrados en el medio agarizado, desarrollaron nuevas colonias que luego fueron transferidas sucesivamente hasta obtener cultivos puros (Porter, 1990).



**Figura 11.**  
**Metodología por cebado**  
**con granos de polen floral**

Para ambas metodologías, en las muestras donde se observó, por microscopía óptica, más de un tipo morfológico de thraustochitrido sobre el medio sólido, se realizaron varios aislamientos para una misma muestra, cuando se reconocieron distintos tipos de colonias que pudieran diferir en alguno de sus rasgos. Una vez purificada la muestra, los thraustochitridos fueron sembrados en medio líquido [extracto de levadura 2g L<sup>-1</sup>, peptona 2 g L<sup>-1</sup>, y glucosa 10 g L<sup>-1</sup>] preparado en agua de mar y/o agua preparada suplementado con antibióticos, para observar por microscopio invertido las distintas morfologías que puedan desarrollar, y así poder tener un criterio más de evaluación.

Finalmente, estos microorganismos fueron mantenidos en medio sólido [extracto de levadura 1g L<sup>-1</sup>, peptona 1 g L<sup>-1</sup>, y agar 13 g L<sup>-1</sup>] preparado en agua preparada suplementado con antibióticos. La incubación se realizó a temperatura ambiente de Tumbes (aproximado 25° C). Subcultivos fueron realizados cada 1 ó 2 meses.

#### **IV.3 Identificación bioquímica: Tinción fluorescente**

La identificación directa de los thraustochitridos se llevó a cabo por tinción con acriflavina mientras que la detección de cuerpos lipídicos en su citoplasma fue por tinción con rojo nilo. Para la tinción con los fluorocromos (acriflavina o rojo nilo), el procedimiento es el mismo: en un microtubo, se adicionó 300ul de cultivo puro y acriflavina o rojo nilo al 1% por un lapso de 20min a temperatura ambiente, seguidamente pasos de centrifugación y lavado son llevados a cabo, la muestra se resuspendió finalmente en 100ul de medio de cultivo para ser montada en lámina y su posterior observación al microscopio confocal de barrido láser (Olympus FLUOVIEW FV1000).

#### IV.4 Identificación molecular: Caracterización del gen 18S rRNA

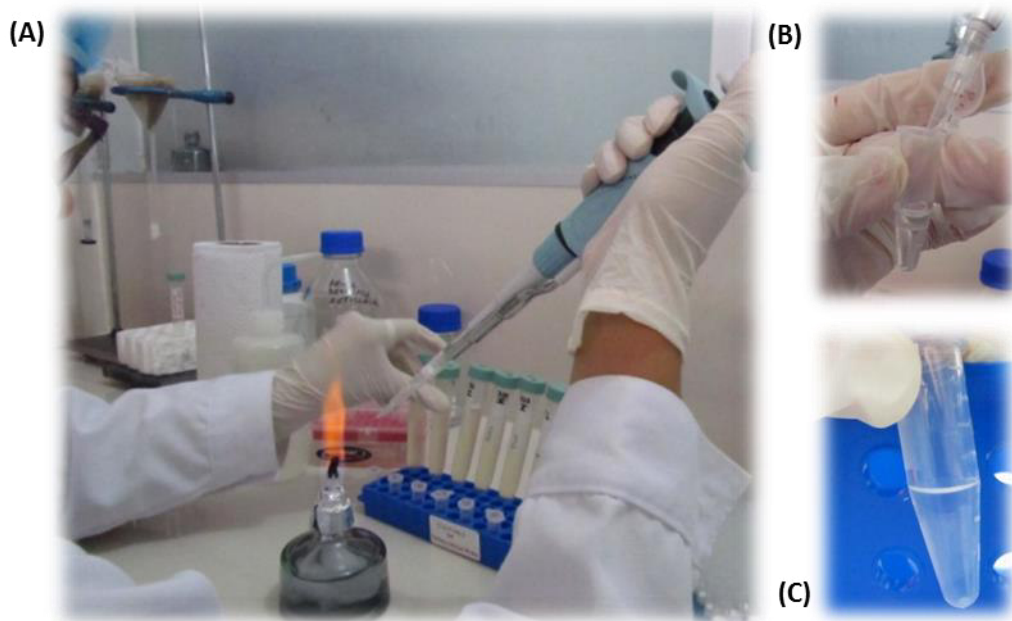
##### IV.4.1 Extracción de ADN genómico

Los microorganismos crecieron en medio líquido [extracto de levadura 2g L<sup>-1</sup>, peptona 2 g L<sup>-1</sup>, y glucosa 10 g L<sup>-1</sup>] preparado en agua preparada (AP). Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 13000 rpm (tubos 1.5ml) por 10 min a 4°C. El *pellet* celular lavado y pesado se resuspendió con *buffer* de lisis (Tris-HCl 20mM, pH 8; EDTA 10mM; SDS 0.5%; NaCl 50mM) (1ml de *buffer* de extracción por 100mg de *pellet* húmedo) y con 100ug mL<sup>-1</sup> de proteinasa K por 45 minutos a 50°C. Luego de esto, el ADN fue extraído inicialmente con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se extrajo dos veces con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). El ADN genómico fue precipitado de la fase acuosa con etanol 100% y acetato de sodio 3M, posteriormente lavado con etanol 70%, secado y resuspendido en 40ul de *buffer* Tris-EDTA. Finalmente, 100 ug mL<sup>-1</sup> de RNAasa A fue añadido a cada microtubo e incubados a 37°C por un tiempo adicional de 15 min. Posteriormente conservado a -20°C (Figura 12).

##### IV.4.2 PCR y secuenciamiento del gen 18S rRNA

Para amplificar una región del gen 18S rRNA se utilizaron los *primers* JVF (5'-TTGATCCTGCCAGTAGTCATAT-3') y JVR (5'-CAAACCTTGTTACGACTTCA-3') (Quilodrán *et al.*, 2010). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 50ul usando Master Mix 2X (FERMENTAS), los *primers* JVF/JVR y ADN de *thraustochitrido*. Un volumen de 1ul de ADN de *thraustochitrido* fue añadido a 49ul de reacción de PCR el cual contiene principalmente 0.2mM

deoxinucleosidotrifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.025U/ul Taq polimerasa, 2.5mM MgCl<sub>2</sub> y 0.4uM de *primer* JVF y JVR, respectivamente. Para la amplificación (Termociclador Veriti 96-Applied Biosystems®) se utilizó el siguiente programa: denaturación a 95°C por 5 min, 33 ciclos de amplificación (45 seg a 95°C, 45 seg a 62°C y 90 seg a 72°C) con una etapa de elongación final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR fueron migrados mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1.5% y visualizados (Transiluminador UV-Cleaver Scientific Ltda®). Finalmente, los productos de PCR fueron enviados a secuenciar en ambos sentidos con el servicio de secuenciación de MacroGen-USA con los cebadores JVF, JVR y otros *primers* que corresponden a regiones internas de la cadena molde (Mo *et al.*, 2002) (Tabla 4).



**Figura 12. Extracción de ADN genómico de los aislados seleccionados (A) Lavado y lisis de cultivo (B) Purificación (C) y Precipitación del ADN**

**Tabla 4. *Primers* externos e internos utilizados para obtener la secuencia del gen 18S rRNA**

<b>PRIMERS EXTERNOS</b>		<b>AUTOR</b>
<b>JVF</b>	5'-TTGATCCTGCCAGTAGTCATAT-3'	Quilodrán <i>et al.</i> , 2010
<b>JVR</b>	5'-CAAACCTTGTTACGACTTCA- 3'	Quilodrán <i>et al.</i> , 2010
<b>PRIMERS INTERNOS</b>		<b>AUTOR</b>
<b>FA1</b>	5'-AAAGATTAAGCCATGCATGT-3'	Mo <i>et al.</i> , 2002
<b>RA1</b>	5'-AGCTTTTAACTGCAACAAC-3'	Mo <i>et al.</i> , 2002
<b>F</b>	5'-GGGAGCCTGAGAGACGGC-3'	Mo <i>et al.</i> , 2002
<b>R</b>	5'-GGCCATGCACCAACCC-3'	Mo <i>et al.</i> , 2002
<b>FA3</b>	5'-CTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	Mo <i>et al.</i> , 2002
<b>RA3</b>	5'-CAATCGGTAGGTGCGACGGGCGG-3'	Mo <i>et al.</i> , 2002

#### **IV.4.3 Edición y obtención de la secuencia consenso**

Las secuencias obtenidas por los *primers* internos (FA1/RA1, F/R y FA3/RA3) y externos (JVF/JVR) fueron ensambladas con el programa Sequencher™ versión 4.1.4. (Gene Codes Corporation, USA) generándose así la secuencia consenso. Además, con este programa se logró visualizar los archivos de cromatograma (extensión .ab1) por lo que permitió la edición de la secuencia consenso de cada aislado.

#### **IV.4.4 Alineamiento múltiple**

Secuencias del gen 18S rRNA de cepas de traustochitridos reportados, labirintúlidos y de los *outgroup* fueron obtenidas del GenBank (Tabla 5) y añadidas al grupo de secuencias de los aislados para su posterior alineamiento múltiple en ClustalX2.1 (Larkin *et al.*, 2007).



Así, el primer paso para un análisis filogenético es el alineamiento de secuencias de nucleótidos o de sus respectivos aminoácidos, de tal manera que, ellos sean homólogos en cada posición. Sin embargo, no todo el alineamiento de secuencias homólogas será útil para la reconstrucción filogenética y es recomendable remover regiones muy divergentes y de muchos *gaps* (Castresana, 2000). Basándose en ello, se identificaron en el alineamiento múltiple cuatro regiones en las posiciones 186-195, 614-976, 1294-1303 y 1416-1440, las cuales fueron retiradas del alineamiento con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

**Tabla 5. Lista de las secuencias del gen 18S rRNA de especies relacionadas usadas en este estudio como taxa de referencia para determinar el género de los aislados**

<b>Taxón</b>	<b>Cepa</b>	<b>Número de Accesión</b>	<b>Referencia</b>
<b>Género <i>Aurantiochytrium</i></b>			
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	SL1101	JN986842.1	Nie, 2012 (inédito)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	-	DQ100294.1	Jaritkhuan <i>et al.</i> , 2006 (inédito)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	OUC101	HM042905.2	Li <i>et al.</i> , 2010 (inédito)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	OUC191	HM042912.2	Li <i>et al.</i> , 2010 (inédito)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	OUC192	HM042913.2	Li <i>et al.</i> , 2010 (inédito)
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	RCC893	DQ367049.1	Tsui <i>et al.</i> , 2009
<b>Género <i>Botryochytrium</i></b>			
<i>Botryochytrium radiatum</i>	SEK 353(RT0304)	AB355410.1	Yokohama <i>et al.</i> , 2007
<b>Género <i>Japonochytrium</i></b>			
<i>Japonochytrium</i> sp.	ATCC 28207	AB022104.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<b>Género <i>Parietichytrium</i></b>			
<i>Parietichytrium</i> sp.	BAFCcult 3109	HQ228977.1	Rosa <i>et al.</i> , 2010
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	-	AB355411.1	Yokohama <i>et al.</i> , 2007
<b>Género <i>Sicyodochytrium</i></b>			
<i>Sicyodochytrium minutum</i>	-	AB355412.1	Yokohama <i>et al.</i> , 2007
<b>Género <i>Schizochytrium</i></b>			
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	-	AB022106.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<b>Género <i>Oblongichytrium</i></b>			
<i>Oblongichytrium minutum</i> (basónimo <i>Schizochytrium minutum</i> )	-	AB022108.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Oblongichytrium multirudimentale</i> (basónimo <i>Thraustochytrium multirudimentale</i> )	-	AB022111.1	Honda <i>et al.</i> , 1999

... Continuación de la Tabla 5

<b>Género <i>Thraustochytrium</i></b>			
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	KMPB N-BA-110	AB022109	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Thraustochytrium aureum</i>	-	GU933120.1	Shene <i>et al.</i> , 2010 (inédito)
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	KMPB 1694d	L34668.1	Cavalier-Smith <i>et al.</i> , 1994
<i>Thraustochytrium pachydermum</i>	KMPB N-BA-114	AB022113.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Thraustochytrium striatum</i>	ATCC 24473	AB022112.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<b>Género <i>Ulkenia</i></b>			
<i>Ulkenia profunda</i>	-	AB022114.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Ulkenia visurgensis</i>	-	AB022116.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Ulkenia radiata</i> ( <i>Botryochytrium radiatum</i> )	-	AB022115.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<b>Otras cepas</b>			
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	-	AB022103.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<i>Labyrinthula</i> sp.	AN-1565	AB022105.1	Honda <i>et al.</i> , 1999
<b>Outgroups</b>			
<i>Cafeteria roenbergensis</i>	-	L27633.1	Leipe <i>et al.</i> , 1994
<i>Prorocentrum micans</i>	-	M14649.1	Maroteaux <i>et al.</i> , 1985

#### **IV.4.5 Caracterización de las secuencias**

Finalmente las secuencias resultantes fueron usadas para hacer la identificación genética de los microorganismos aislados, comparándolas con secuencias de microorganismos disponibles en la base de datos del banco de genes (GenBank database) (Nacional Center for Biotechnology Information, USA: NCBI Home page <http://www.ncbi>). Y la búsqueda de secuencias homólogas más cercanas fue realizada utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en NCBI web servidor.

El análisis de sitios conservados, variables e informativos fue realizado en MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

#### **IV.4.6 Divergencia de las secuencias 18S rRNA**

Los alelos fueron encontrados usando el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009). La distancia genética entre los aislados y secuencias de géneros reportados de thraustochitridos fue calculada con el programa MEGA 6 utilizando el modelo Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980).

#### IV.4.7 Análisis filogenético molecular

En la identificación genética de los microorganismos aislados, un análisis adicional al BLAST es la construcción de un árbol filogenético, el cual resulta adecuado en la determinación del género y/o especie de los aislados.

Los análisis filogenéticos de los alelos encontrados con secuencias de microorganismos representantes de thraustochitridos, labirintúlidos y *outgroups* (*Prorocentrum micans* y *Cafeteria roenbergensis*) se realizaron con varios métodos.

El análisis de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) se llevaron a cabo con el programa PAUP v4.0b (Swofford, 1998). Para este último análisis previamente se requiere la información del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se adapte a las secuencias, lo que fue proporcionado por el programa jModelTest (Darriba *et al.*, 2002), el cual selecciona el modelo adecuado según el criterio de información de Akaike (AIC) (Posada y Buckley, 2004).

La información proporcionada por jModelTest fue utilizada para el análisis de máxima verosimilitud (ML) por PAUP. Para los análisis de MP y ML, el soporte de los nodos se calculará a partir de 1000 submuestras mediante el test de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

El análisis de inferencia bayesiana (IB) se realizó utilizando el programa Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) con los parámetros propuestos por el programa jModeltest. En el análisis se asegura conseguir al menos mil muestras de la distribución de probabilidad posterior. Además, se considera una desviación estándar por debajo de 0.05, por lo que se agregó más generaciones hasta que el valor cayó por debajo de 0.01.

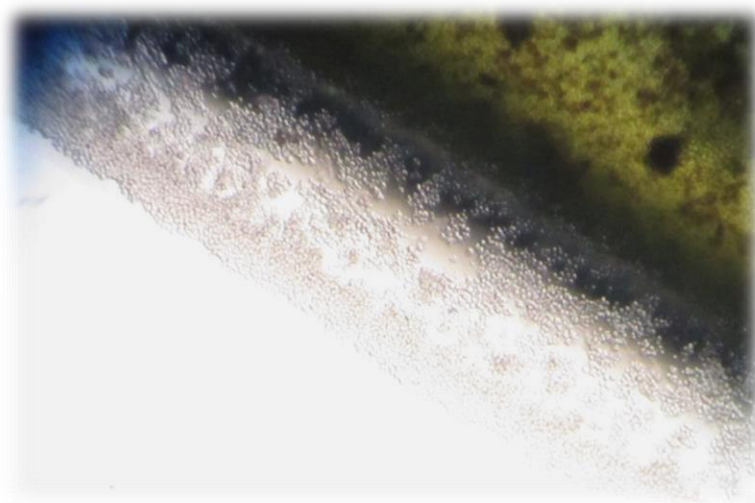
Los árboles resultantes de estos análisis fueron visualizados Figtree v.1.0.4 (Rambaut, 2006-2012).

## **V. RESULTADOS**

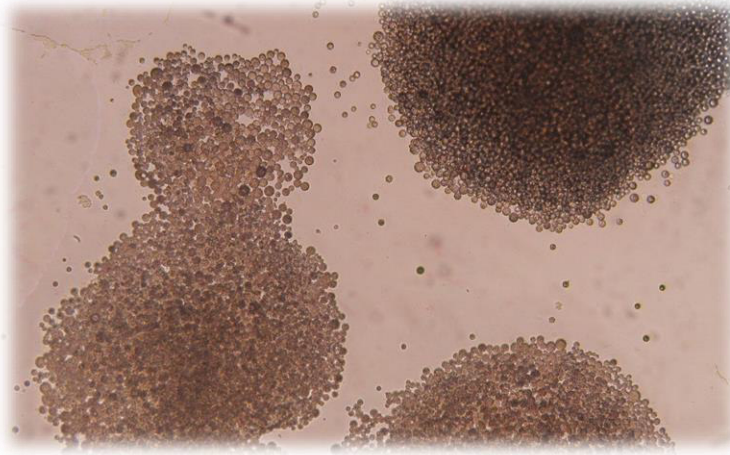
### **V.1 Aislamiento y mantenimiento de cepas de Thraustochitridos**

#### **V.1.1 Aislamiento y crecimiento**

En el contorno de las hojas de mangle (Figura 13) y adheridos al grano de polen crecieron los microorganismos de interés. El proceso de aislamiento culminó hasta obtenerlas en cultivo puro, seleccionándolas en base a características morfológicas observadas en placa como fueron la coloración de la colonia, textura, tamaño, presencia de red ectoplasmática, etc. que permitieron reducir el número de cepas redundantes por lo que se aislaron entre 5 a 15 cepas para cada uno de los 30 puntos de muestreo (Tabla 1). Por otro lado, los valores de temperatura fluctuaron entre 25.4 y 28.6°C, los valores de pH entre 7-8 y los valores de salinidad fluctuaron entre 10 y 33‰ (Tabla 1); en esto último, los valores más altos implican muestras de agua provenientes de zonas aledañas al mar.



**Figura 13. Thraustochitridos en el contorno de la hoja de mangle (400X)**



(A)



(B)



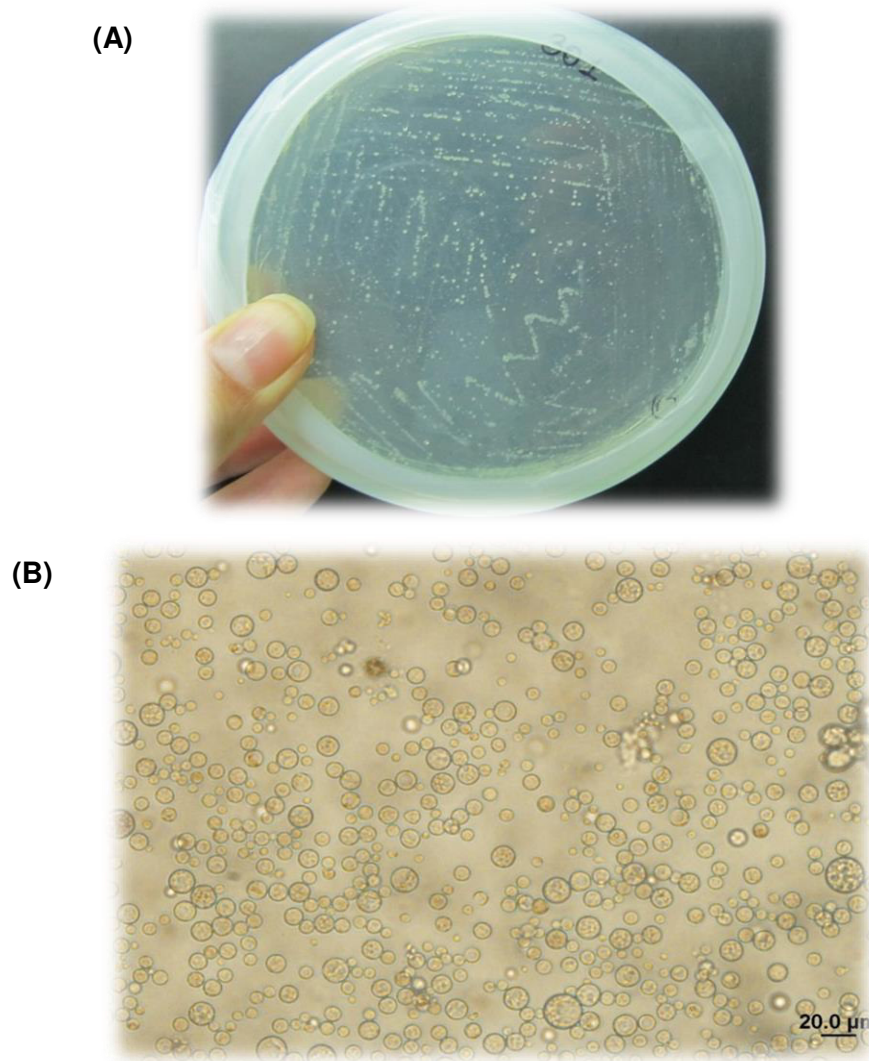
(C)

**Figura 14. (A) Crecimiento de los Thraustochitridos en medio sólido libres de contaminación (B) Contaminación por bacterias (C) Contaminación por hongos. Visualizados por microscopía óptica (400X)**



La eliminación de la flora bacteriana y hongos fue bastante difícil, a pesar del uso de antibióticos (Figura 14). Para el segundo caso, se probó utilizar Nistatina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) como antifúngico demostrando erradicar problemas de contaminación causado por este microorganismo (Gupta *et al.*, 2012). Inicialmente se había optado utilizar Fluconazol, pero inhibía el crecimiento de los thraustochitridos.

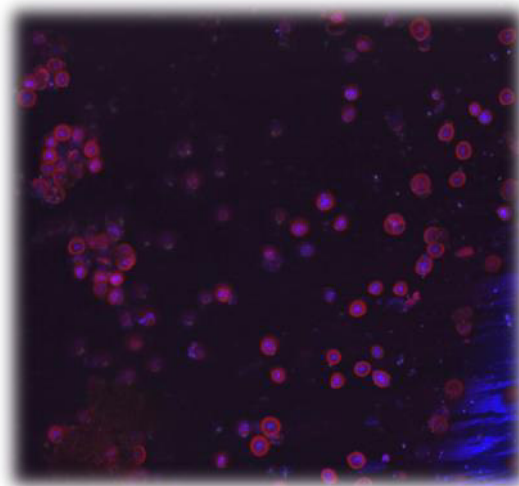
Los thraustochitridos crecieron tanto en medio al 15% como al 70%, observándose un óptimo crecimiento en esta última concentración (Figura 15).



**Figura 15. (A) Crecimiento de los Thraustochitridos en medio sólido y (B) medio líquido visualizado por microscopio invertido (400X).**

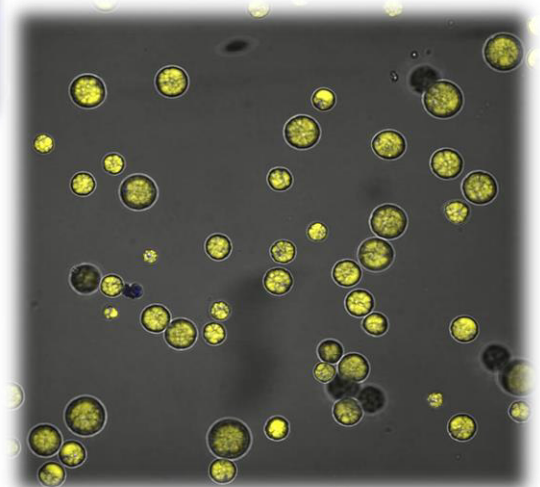
## V.2 Identificación bioquímica con tinción con acriflavina y rojo de nilo

En esta etapa solo se pudo realizar la identificación bioquímica para los primeros 50 aislados por un inconveniente técnico con el equipo. La tinción con acriflavina, permitió confirmar la ocurrencia de thraustochitridos en los manglares de Tumbes al fluorescer la pared celular de color rojo y su contenido celular de color azul-verde (Figura 16). Por otro lado, se corroboró la presencia de un ambiente rico en lípidos en el interior de estos microorganismos, visualizándose una fuerte emisión de color amarillo-oro al ser teñidos los aislados con rojo de nilo (Figura 17).



**Figura 16. Thraustochitridos, protistas teñidos con acriflavina (pared celular: rojo; contenido celular: azul) visualizado por microscopio confocal (400X)**

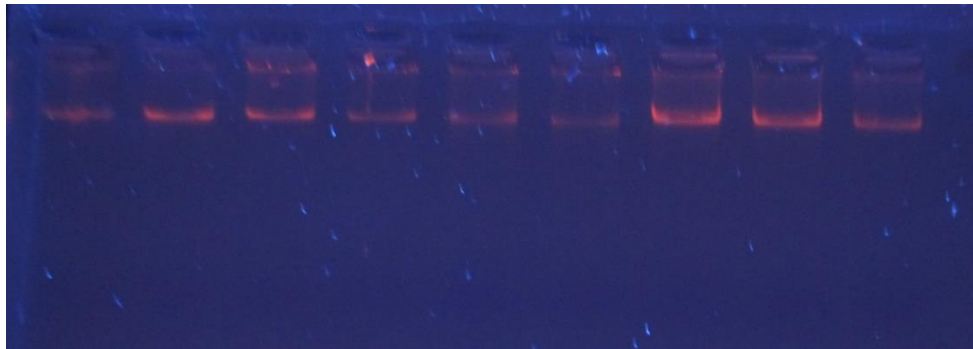
**Figura 17. Thraustochitridos, protistas teñidos con rojo de nilo (interior: amarillo-oro), visualizado por microscopio confocal (400X)**



### V.3 Caracterización molecular del gen 18S rRNA

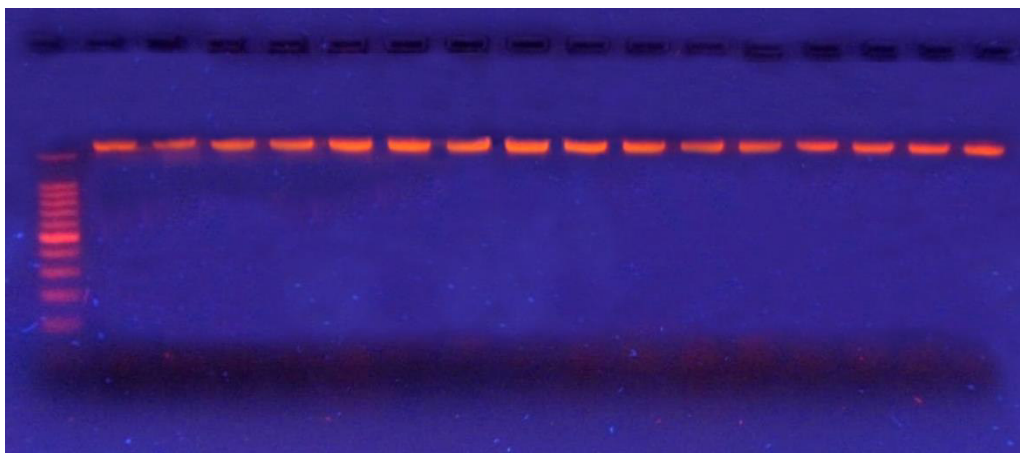
#### V.3.1 Extracción de ADN, PCR y secuenciamiento del gen 18S rRNA

Con los aislados que presentaron las características morfológicas reportadas para thraustochitridos se realizaron las extracciones de ADN basándose en la metodología propuesta por Lippmeir y colaboradores (2009). La presencia y la calidad del ADN extraído de las muestras se confirma tanto por migración en gel de agarosa al 1% como por la capacidad de amplificación por PCR. El ADN extraído está presente, intacto y es amplificable (Figura 18).



**Figura 18. Migración en gel de agarosa 1% de las extracciones de ADN genómico**

La amplificación con los primers JVF/JVR dio una banda ultravioleta en el transiluminador mayor a 1000 pb y la aparición de una única banda por muestra es prueba de la amplificación específica (Figura 19). Inicialmente, con las primeras amplificaciones con estos *primers* había la presencia de *smear*, por lo que se optó disminuir el número de ciclos, evaluar otras temperaturas de *annealing*, concentración de ADN y cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ).



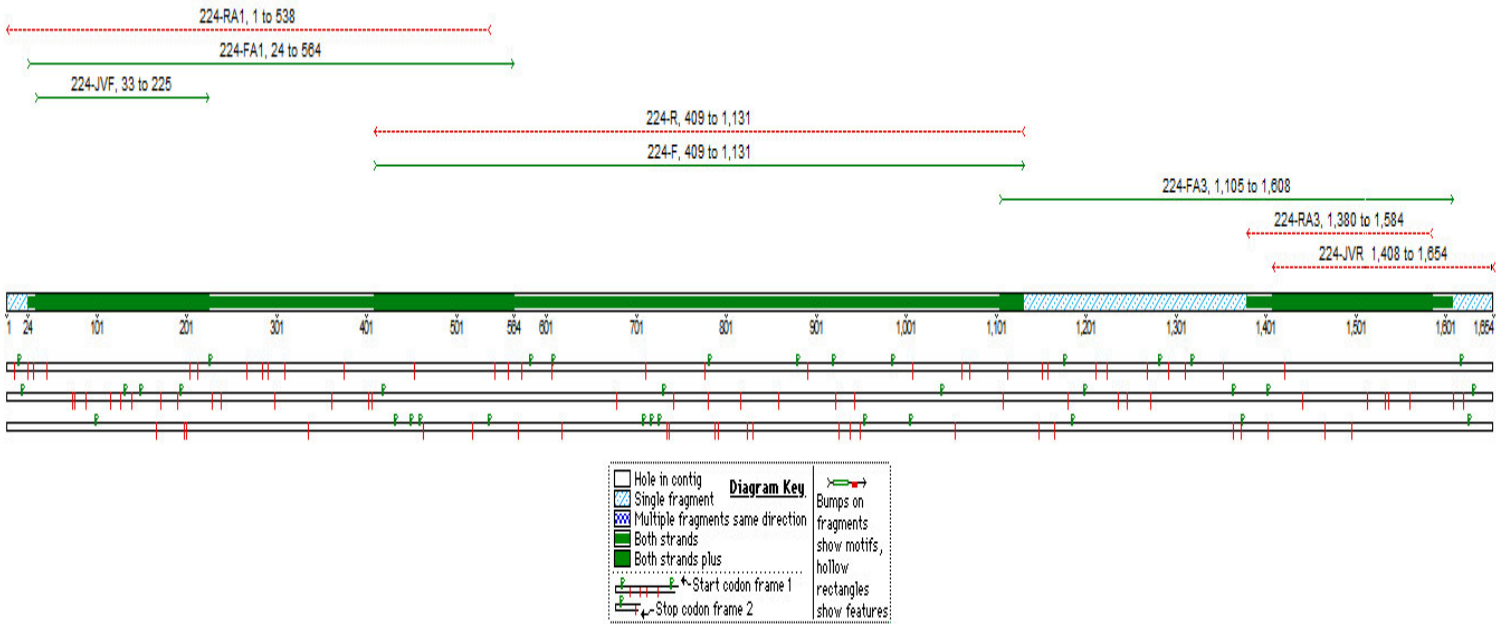
**Figura 19. De izquierda a derecha. Carril 1: Marcador de tamaño molecular de 1000pb. Carril 2 a 16: Amplificación del gen 18S rRNA de los aislados Thraustochitridos visualizados en gel de agarosa 1.5%**

### V.3.2 Ensamblaje y edición de secuencias

Alineamientos de las secuencias de cada juego de *primer* interno se realizaron con el programa Sequencher™ Versión 4.1.4 (Gene Codes Corporation, USA), luego estos *contigs* generados por cada juego de *primer* se ensamblaron nuevamente para generar la secuencia consenso cuyo tamaño aproximado fue de 1700 pb (Figura 20) lo cual es compatible a lo observado en gel (Figura 19). En la figura 21 se esquematiza las posiciones de hibridación de los *primers*. La secuencia consenso obtenida fue editada teniendo la certeza de la base a modificar y tomando como referencia los archivos de cromatograma. En los casos donde había ambigüedad de base se optó colocar degeneraciones.

Un caso particular sucedió solo en las secuencias que posteriormente identificaríamos como del género *Aurantiochytrium*, donde se observó un ruido constante en las posiciones 578 al 602 y 1360 al 1385 aproximadamente (Figura 22).

Finalmente, las secuencias del gen 18S rRNA generadas para todos los 268 aislados fueron guardadas en un archivo de texto cuyo análisis ayudó en la identificación y clasificación de los aislados.



**Figura 20. Secuencia consenso obtenida por solapamiento con el programa Sequencher**

### FA1/RA1

AAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATAAGCGATTGTAAGTGTGAGACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTAATAATTCTTCGGTAGTTCTT  
TTATATGGATACCTGCAGTAATCTGGAAATAATACATGCTGTAAGAGCCCTGTATGGGGCTGCACTTATTAGATTGAAGCCGATTATTATGGTGAAT  
CATGATAATTGAGCAGATTGACTTTTTAGTCGATGAATCGTTTGAGTTTCTGCCCATCAGTTGTCAGCGTAGTGTATTGGACTACGGTGACTATAA  
CGGGTGACGGAGAGTTAGGGCTCGACTCCGGAGA GGGAGCCTGAGAGACGGCTACCATATCCAAGGATAGCAGCAGCGCGTAAATTACC  
CACTGTGGACTCCACGAGGTAGTGACGAGAAATATCGATGCGAAGCGTGTATGCGTTTTGCTATCGGAATGAGAGCAATGTAAACCCCTCATCGAGG  
ATCAACTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAGAAGCATATGCTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCT

### F/R

CTGTGGACTCCACGAGGTAGTGACGAGAAATATCGATGCGAAGCGTGTATGCGTTTTGCTATCGGAATGAGAGCAATGTAAACCCCTCATCGAGGAT  
CAACTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAGAAGCATATGCTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG  
AATTTCTGGCATGGGCGACCGGTGCTTTCCCTGAATGGGGATTGATTGCTGTGTTGCCCTGGCCATCTTTCTCATTTTTTTTGGGGAGAAATCTTTC  
ACTGTAATCAAAGCAGAGTTTCAAGCAGGTGCTATGACCGGTATGTTTATTATGGGATGATAAGATAGGACTTGGGTGCTATTTTGTGTTGCA  
CGCCTGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGTATTGCTATTTAGGAGCTAGAGGTGAAATTTCTGGATTTCGAAAGACGAACTAGAGCGAAGG  
CATTTACCAAGCATGTTTTATTAAATCAAGAACGAAAGTCTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAGACCGTAAACGATGCCGACTTG  
CGATTGTTGGGTGCTTTATTAAGGGCCTCAGCAGCAGCATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGAAGGCTGAAAATT  
AAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACGAGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACT

### FA3/RA3

TTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGGTAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTTCATGATTCTATGGGTGGTGGTGC  
ATGGCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACGAGACCTCGGCCTACTAAATAGTGCCTGGTATGGCAACATAGT  
GCGTTTTAATCTTAGAGGACATGTCGGGTTACGGGCGAGGAAGTTCGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGC  
GCGTTACACTGATGGGTTTCATCGGGTTTTTTTTTTTTTTGATCAAGAGTGCTTGGTCGGAAGGCCTGGCTAATCCTTGAACGCTCATCGTGTGGG  
GCTAGATTTTTGCAATTATTAACTCCAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCAAGTCATCAGCTTGCAATTGAATACGTCCTGCCCTTGTATACACA  
CCGTCGCACCTACCGATTG

### SECUENCIA CONSENSO GENERADA PARA EL AISLADO 72

AAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATAAGCGATTGTAAGTGTGAGACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTAATAATTCTTCGGTAGTTCTT  
TTATATGGATACCTGCAGTAATCTGGAAATAATACATGCTGTAAGAGCCCTGTATGGGGCTGCACTTATTAGATTGAAGCCGATTATTATGGTGAAT  
CATGATAATTGAGCAGATTGACTTTTTAGTCGATGAATCGTTTGAGTTTCTGCCCATCAGTTGTCAGCGTAGTGTATTGGACTACGGTGACTATAA  
CGGGTGACGGAGAGTTAGGGCTCGACTCCGGAGA GGGAGCCTGAGAGACGGCTACCATATCCAAGGATAGCAGCAGGCGGTAAATTACC  
CACTGTGGACTCCACGAGGTAGTGACGAGAAATATCGATGCGAAGCGTGTATGCGTTTTGCTATCGGAATGAGAGCAATGTAAACCCCTCATCGAGG  
ATCAACTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAGAAGCATATGCTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGT  
TGAATTTCTGGCATGGGCGACCGGTGCTTTCCCTGAATGGGGATTGATTGTCTGTGTTGCCCTGGCCATCTTTCTCATTTTTTTTGGGGAGAAATCTT  
TCACTGTAATCAAAGCAGAGTTTCAAGCAGGTGCTATGACCGGTATGTTTATTATGGGATGATAAGATAGGACTTGGGTGCTATTTTGTGGTTTG  
CACGCTGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGTATTCGATTTAGGAGCTAGAGGTGAAATCTTGGATTTCGAAAGACGAACTAGAGCGAA  
GGCATTACCAAGCATGTTTTATTAAATCAAGAACGAAAGTCTGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTAGACCGTAAACGATGCCGACT  
TGCGATTGTTGGGTGCTTTATTAAGGGCCTCAGCAGCAGCATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGAAGGCTGAAAC  
TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACGAGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGG  
TAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTTCATGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCGTTCTTAGTTAGTTGGTGGAGTGATTGTCTGGTTAATTCG  
TTAACGAACGAGACCTCGGCCTACTAAATAGTGCCTGGTATGGCAACATAGTGCCTTTAACTTCTTAGAGGGACATGTCGGGTTTACGGGCGAGGA  
GTTTCGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCTTACACTGATGGGTTTCATCGGGTTTTTTTTTTTGTATCAA  
GAGTGCTTGGTGGAGGCGCTGCTAATCCTTGAACGCTCATCGTGGGGCTAGATTTTGAATTATTAACTCCAACGAGGAATTCCTAGTAA  
ACGCAAGTCATCAGCTTGCAATTGAATACGTCCTGCCCTTGTATACACA CCGCCCGTCGCACCTACCGATTG

**Figura 21. Ubicación de los *primers* internos en la secuencia del aislado 72.**  
**FA1 (en color amarillo, posición 37-56); RA1 (en color verde, posición 605-624);**  
**F (en color celeste, posición 387-404); R (en color rojo, posición 1254-1271); FA3**  
**(en color fucsia, posición 1125-1144) y RA3 (en color marrón, posición 1662-**  
**1684)**



**Figura 22. Cromatograma mostrando la posición 1360 al 1385 aproximadamente del aislado 72, donde se identificó uno de los ruidos característicos en aislados de *Aurantiochytrium* sp. Nótese la región poliT.**

### V.3.3 Verificación de las secuencias 18S rRNA por BLAST

Los resultados de la búsqueda de secuencias homólogas con BLAST (Tabla 6), mostraron que la mayor parte de los aislados de este estudio tuvieron un mejor *hit* con secuencias de *Schizochytrium limacinum* y *Aurantiochytrium* sp., donde el primero fue redeterminado posteriormente como *Aurantiochytrium limacinum* por Yokohama y Honda (2007).

Por otro lado, algunos aislados tuvieron un mejor *hit* con secuencias de *Parietichytrium* sp., *Botryochytrium* sp., *Ulkenia aff. visurgensis* y en algunos casos el mejor *hit* fue con secuencias que tienen una asignación taxonómica a nivel de familia.



**Tabla 6. Resultados del análisis por BLAST en la base de datos del GenBank de cada uno de los 56 alelos encontrados en el presente estudio. En todos los casos correspondió al gen 18S rRNA; para cada alelo se presenta el mejor *hit* encontrado. Entre paréntesis se indica el número de cepas por alelo**

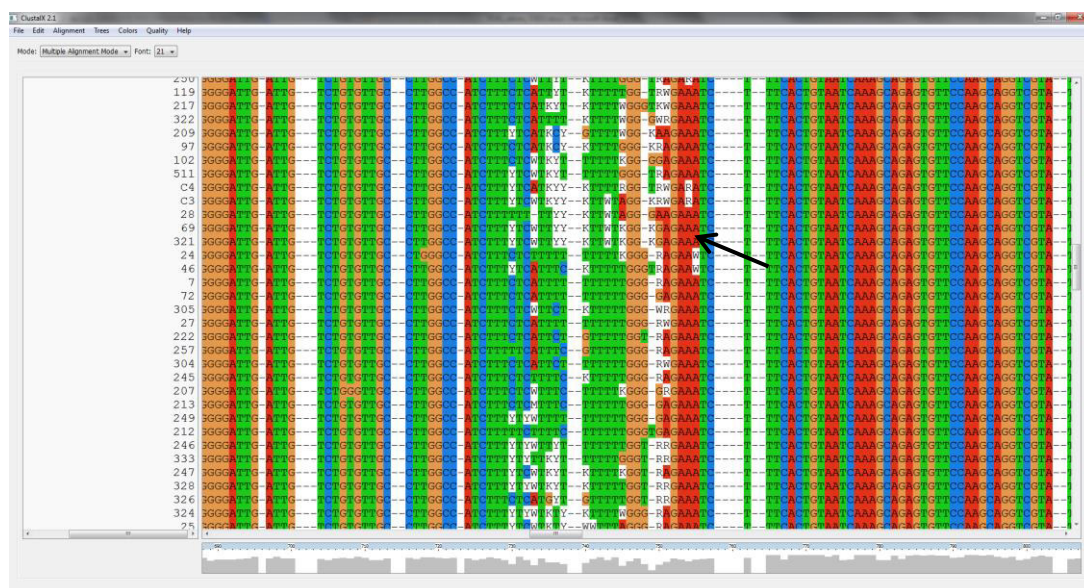
Alelo	Cepa/aislado	Mejor <i>hit</i> en BLASTn	Número de accesión	Valor E	Identidad
<b>1 (200)</b>	1 3 5 7 10-13 21 25 27 30 32 34 35-40 42 44 46 50 51 53-56 58 60-63 66 68 69 71 73 76-80 84-87 89 90 93-98 100-108 111 113 119 122 124 128 130 131 137 143-147 149 150 151 154 155 157 161-163 165 167-175 201-204 206 209- 224 226-229 231 234-239 241 242 245-252 257 258 303-306 308-312 314 316- 319 321 322 324-328 330- 335 337-340 501-503 508 511 513 516-522 524 525 528 529 531 532 534-539 C3 C4	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC175	HM042911.2	0.0	99%
<b>2 (1)</b>	230	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC191	HM042912.2	0.0	99%
<b>3 (1)</b>	59	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>4 (1)</b>	329	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	97%
<b>5 (1)</b>	20	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	97%
<b>6 (1)</b>	323	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>7 (1)</b>	24	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>8 (1)</b>	255	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>9 (1)</b>	207	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>10 (1)</b>	72	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	99%
<b>11 (1)</b>	112	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>12 (1)</b>	28	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>13 (1)</b>	45	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>14 (1)</b>	313	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY- 2012	JX847370.1	0.0	98%

15 (1)	6	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
16 (1)	31	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
17 (1)	65	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	97%
18 (1)	52	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
19 (4)	8 121 506 530	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
20 (1)	4	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
21 (1)	540	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	97%
22 (1)	315	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
23 (1)	91	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
24 (5)	48 134 225 232 244	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
25 (1)	509	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
26 (1)	123	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
27 (1)	92	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
28 (1)	208	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
29 (1)	140	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
30 (1)	114	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
31 (1)	240	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
32 (1)	243	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
33 (1)	16	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
34 (1)	18	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
35 (1)	88	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
36 (1)	C8	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
37 (1)	256	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
38 (1)	82	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
39 (1)	43	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
40 (1)	19	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%

<b>41 (1)</b>	514	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	99%
<b>42 (1)</b>	33	<i>Aurantiochytrium</i> sp. LY-2012	JX847370.1	0.0	98%
<b>43 (1)</b>	526	<i>Schizochytrium</i> sp. AMCQS1	JX993843.1	0.0	98%
		<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W	AB811030.1	0.0	98%
<b>44 (1)</b>	75	<i>Schizochytrium</i> sp. AMCQS1	JX993843.1	0.0	98%
		<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W	AB811028.1	0.0	98%
<b>45 (1)</b>	507	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W	AB811028.1	0.0	98%
<b>46 (2)</b>	510 512	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 15A	AB811008.1	0.0	98%
<b>47 (1)</b>	527	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 15W	AB811016.1	0.0	98%
<b>48 (1)</b>	523	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W	AB811030.1	0.0	98%
<b>49 (1)</b>	C1	<i>Thraustochytriidae</i> sp. T65	DQ836629.1	0.0	98%
<b>50 (1)</b>	120	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	AB355411.1	0.0	97%
<b>51 (1)</b>	117	<i>Parietichytrium</i> sp. 9F-4a g	AB810975.1	0.0	97%
<b>52 (1)</b>	118	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	AB355411.1	0.0	97%
<b>53 (1)</b>	307	<i>Parietichytrium</i> sp. 6F-2a	AB810971.1	0.0	98%
<b>54 (1)</b>	49	<i>Parietichytrium</i> sp. 6F-2a	AB810973.1	0.0	98%
<b>55 (4)</b>	541 542 544 548	<i>Botryochytrium</i> sp. TMR16	AB810986.1	0.0	99%
<b>56 (3)</b>	543 545 546	<i>Ulkenia</i> aff. <i>visurgensis</i> BAFCcult 3484	HQ228961.1	0.0	98%

### V.3.4 Alineamiento múltiple

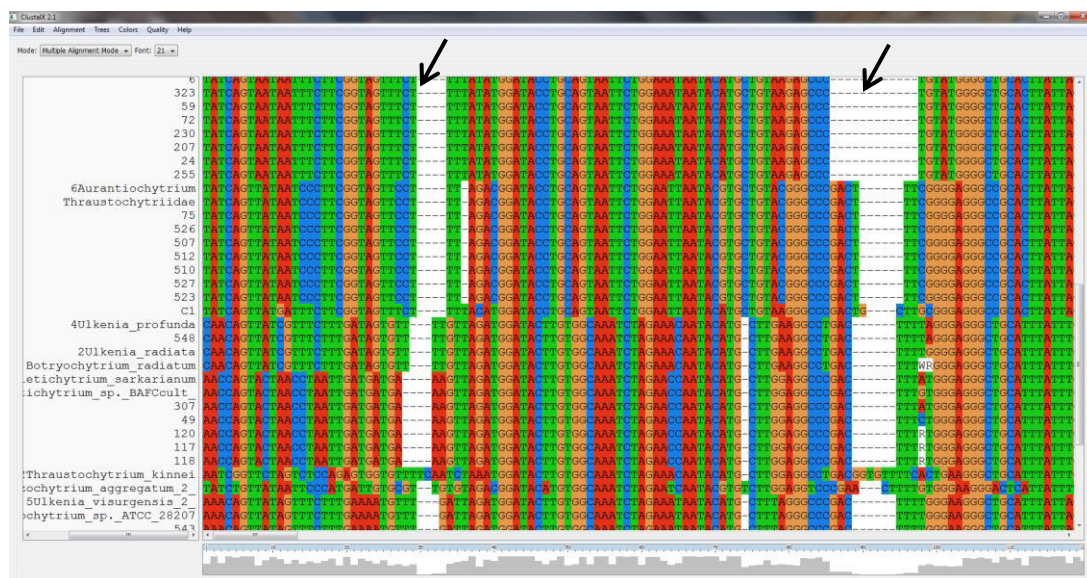
El alineamiento múltiple de las secuencias del 18S rRNA resultó en 1582 sitios alineados, pero se detectó zonas de ruido o bases degeneradas que era imprescindible eliminar, como es visualizado en las Figuras 22 y 23. El alineamiento muestra una zona de ruido imposible de determinar la base correcta durante la edición de la secuencia y, según lo comentado líneas arriba, ello se observó solo en secuencias de *Aurantiochytrium* sp., que conformaban la mayor parte de los aislados.



**Figura 23. Una de las regiones eliminadas del alineamiento múltiple por la presencia de numerosas bases degeneradas**

Tras eliminar las cuatro regiones de las posiciones 186-195, 614-976, 1294-1303 y 1416-1440, el alineamiento resultó en 1175 sitios alineados detectándose varias zonas de inserción o deleción denominados *indels*. La Figura 24 nos muestra los dos primeros *indels* del alineamiento.

El alineamiento final presentó 579 sitios conservados, 586 posiciones variables y 449 sitios informativos.



**Figura 24. Alineamiento final utilizado en los análisis filogenéticos**

### V.3.5 Divergencia en las secuencias 18S rRNA

Con las secuencias preparadas para el análisis filogenético, fue necesario previamente determinar el número de alelos presentes entre los 268 aislados por lo que se realizó un nuevo alineamiento de solo estas 268 secuencias del gen 18S rRNA.

El alineamiento resultó en 1136 sitios alineados con 809 sitios conservados, 324 sitios variables y 305 sitios parsimoniosamente informativos. Utilizando el programa DNAsp se encontraron 56 alelos (Figura 25) entendiéndose éstos por variantes de la secuencia 18S rRNA.

Los resultados de la búsqueda de secuencias homólogas para cada uno de los alelos con BLAST, se muestra en la Tabla 6.



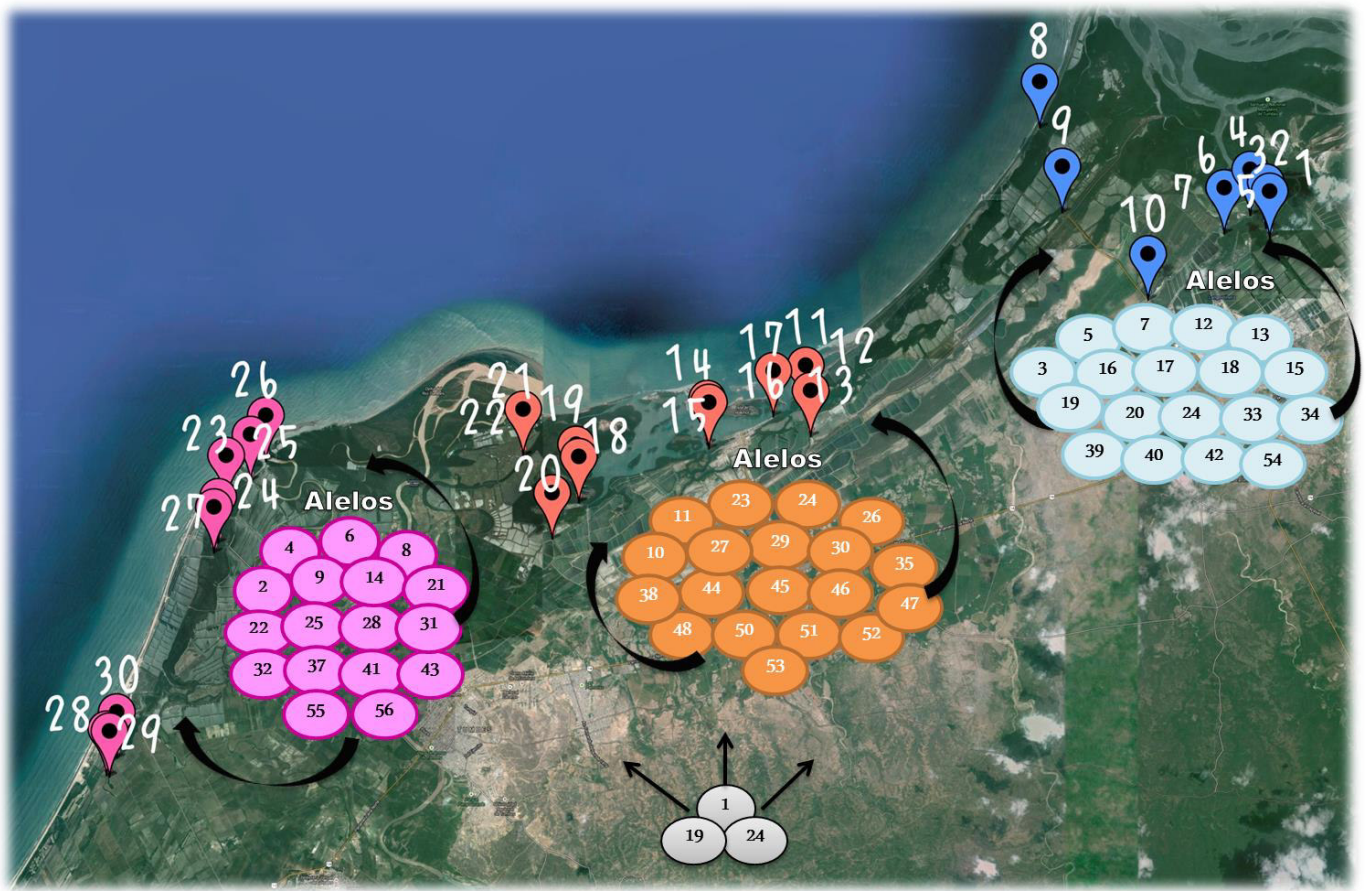


Figura 25. Distribución de los 56 alelos encontrados en los tres puntos de muestreo (primer día de muestreo en color celeste; segundo día, en color naranja; tercer día, en color rosado; en color plomo, alelos compartidos en los tres puntos)

### **V.3.6 Análisis filogenético**

#### ***V.3.6.1 Utilizando PAUP (Métodos MP y ML)***

La figura 26 muestra el árbol filogenético generado por PAUP utilizando el método máxima parsimonia (MP). El análisis de máxima verosimilitud (ML) en el cual se aplicaron los parámetros del modelo de sustitución nucleotídica propuesto por el jModelTest (TrN+I+G: G= 0.5200, I= 0.2380), también nos muestra resultados similares, ambos revelan tres grandes linajes de taxa: los labirintúlidos y los thraustochitridos, ya previamente reportado en otros trabajos (Honda *et al.*, 1999; Leander y Porter, 2001). Este árbol muestra que dentro del linaje que comprende a los thraustochitridos, nuestros aislados se encuentran ubicados en los clados de los principales géneros, presentando similitudes con *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Botryochytrium* y *Ulkenia*. Esta relación cercana está soportada por altos valores de *bootstrap* (mayores al 70%).

#### ***V.3.6.2 Utilizando Mr. Bayes (Método IB)***

Por otro lado, el análisis de inferencia bayesiana (Figura 27) también presentó resultados similares a los análisis anteriores, confirmando el soporte de los grupos de secuencias propuestos.

En este análisis no se muestran valores de *bootstrap*, sino valores de probabilidad posterior para cada clado. Los clados obtuvieron altos índices de probabilidad posterior (mayores a 0.9).

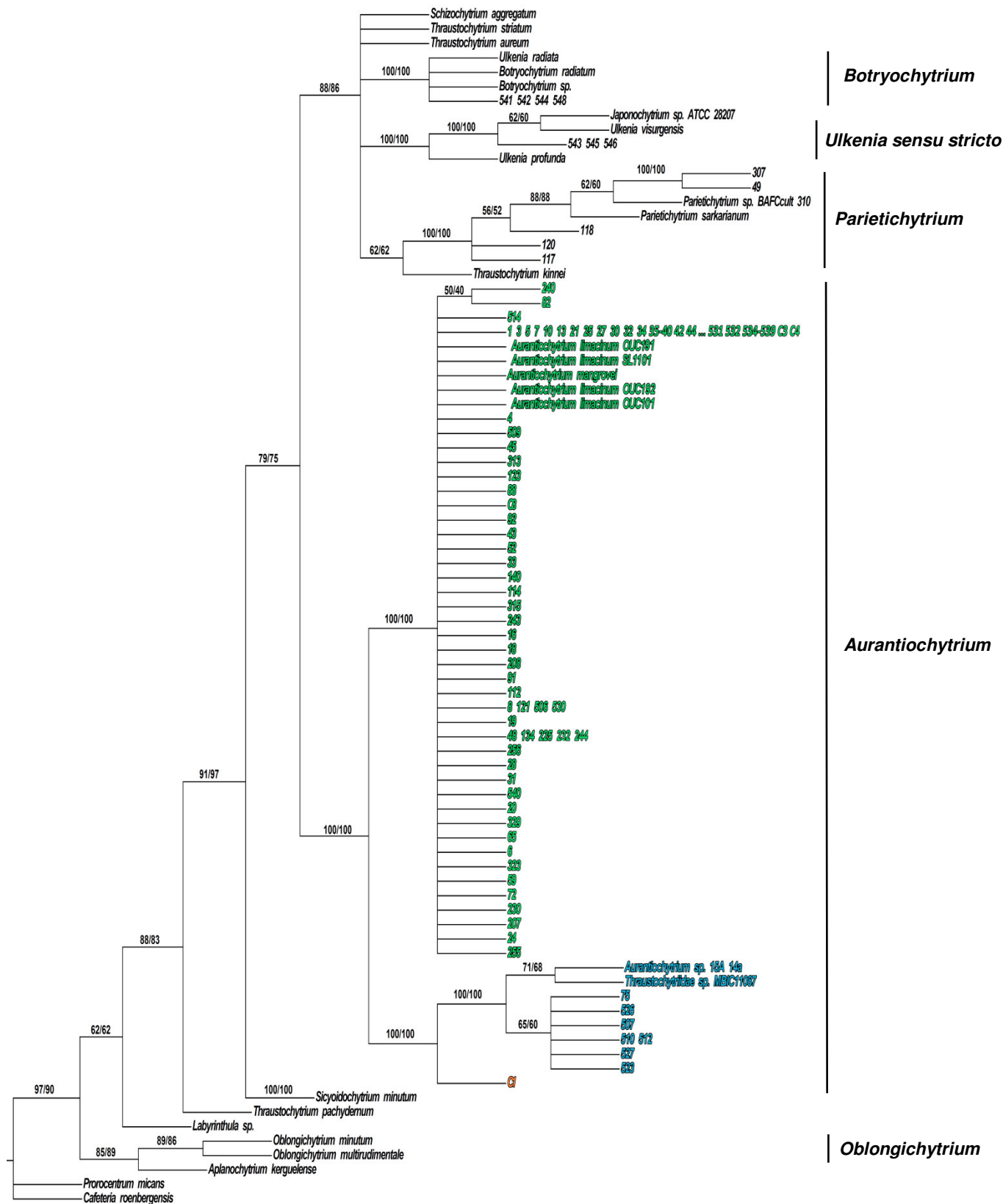


Figura 26. Árbol filogenético basado en el marcador 18S rRNA de los aislados, secuencias de thraustochitridos y labirintúlidos previamente reportadas en la base de datos. *P. micans* y *C. roenbergensis* como grupo externo. Los números en nodo muestran los valores de soporte del bootstrap (MP/ML), para nodos soportados por más del 50% de 1000 réplicas



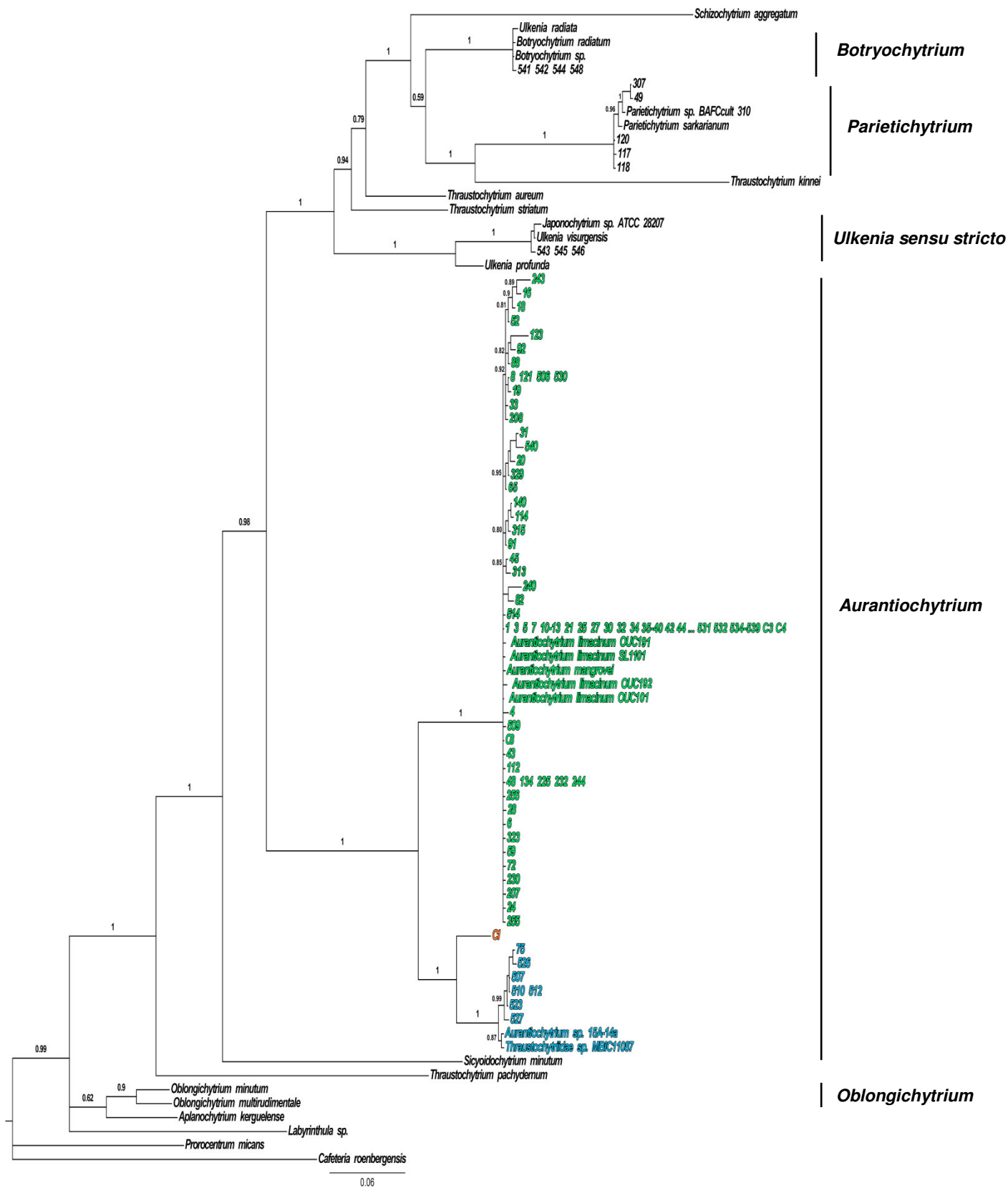


Figura 27. Árbol filogenético generado por IB, basado en el marcador 18S rRNA de los aislados, secuencias de thraustochitridos y labirintúlidos previamente reportadas en la base de datos. *P. micans* y *C. roenbergensis* como grupo externo. La barra representa 0.06 mutaciones

### **V.3.7 Análisis de distancias genéticas entre taxa**

#### **V.3.7.1 Matriz de distancia entre géneros reportados**

Este análisis se realizó entre las secuencias de los diferentes géneros reportados para los thraustochitridos (Tabla 7). En cuanto a las diferencias observadas, por ejemplo entre *Aplanochytrium* sp. y los otros géneros propuestos en el análisis, la divergencia entre *Oblongichytrium* sp., *Sicyoidochytrium* sp., *Ulkenia* sp., *Botryochytrium* sp., *Japonochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp., *Parietichytrium* sp. con *Aplanochytrium* sp., fue entre un 5.37-5.72%, 16.39-16.67%, 14.83-15.43%, 14.15-15.03%, 15.33%, 13.15-22.84%, 21.13-22.13%, 18.45-19.05%, 18.18-18.60%, respectivamente.

Por último, los valores de divergencia encontrados entre especies del mismo género son: en *Aplanochytrium* valores entre 0.41-0.65%; en *Oblongichytrium*, 2.97%; en *Sicyoidochytrium*, 0%; en *Ulkenia*, 0.16-4.6%; en *Botryochytrium*, 0.73%; en *Thraustochytrium*, 7.85-22.44%; en *Schizochytrium*, 2.55%; en *Aurantiochytrium*, 0.41-6.35%; en *Parietichytrium*, 0.24%.

#### **V.3.7.2 Matriz de distancia intraespecífica**

Por otro lado, la matriz de divergencia realizada para *Aurantiochytrium* (Tabla 8) mostró que posee entre 0-1.8% de divergencia entre las secuencias de la especie *A. limacinum* analizadas; y cuando son comparadas éstas con secuencias de *Aurantiochytrium* sp.15A-14a y secuencias de los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526, la divergencia varía en 6.85-8.71% y, a su vez entre éstas es de un 0.38-0.37%.

Finalmente, cuando las secuencias de *A. limacinum* son comparadas con el aislado C1, la divergencia presenta valores de divergencia entre un 6.85-7.06%. Adicionalmente, se calculó una matriz de divergencia entre los géneros reportados en la base de datos con las secuencias de los aislados en cuestión (75, 510, 512 y C1) (Tabla 9).

La matriz de divergencia realizada para *Parietichytrium* (Tabla 10) mostró valores entre 0-0.64%.

La matriz de divergencia realizada para *Ulkenia* (Tabla 11) mostró valores entre 0-0.64% y para *Botryochytrium* valores entre 0-0.18%.

**Tabla 7. Divergencia de las secuencias del marcador 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies de los géneros *Aplanochytrium*, *Oblongichytrium*, *Sicyodochytrium*, *Ulkenia*, *Botryochytrium*, *Japonochytrium*, *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Parietichytrium***

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 <i>Aplanochytrium kerguelense</i>	0.00																								
2 <i>Aplanochytrium minutum</i>	0.65	0.00																							
3 <i>Aplanochytrium stocchinoi</i>	0.57	0.41	0.00																						
4 <i>Oblongichytrium minutum</i>	5.72	5.90	5.72	0.00																					
5 <i>Oblongichytrium multirudimentale</i>	5.63	5.63	5.37	2.97	0.00																				
6 <i>Sicyodochytrium minutum</i>	16.67	16.39	16.58	17.31	17.10	0.00																			
7 <i>Sicyodochytrium</i> sp.	16.67	16.39	16.58	17.31	17.10	0.00	0.00																		
8 <i>Ulkenia amoeboides</i>	15.43	15.33	15.34	14.96	15.05	18.11	18.11	0.00																	
9 <i>Ulkenia profunda</i>	14.83	14.83	14.94	14.56	14.36	17.32	17.32	4.60	0.00																
10 <i>Ulkenia visurgensis</i>	15.23	15.13	15.14	14.76	14.85	18.12	18.12	0.16	4.42	0.00															
11 <i>Botryochytrium radiatum</i>	14.64	14.15	14.44	14.24	13.96	16.56	16.56	10.71	10.34	10.52	0.00														
12 <i>Botryochytrium</i> sp.	15.03	14.44	14.73	14.53	14.25	16.96	16.96	10.62	10.34	10.43	0.73	0.00													
13 <i>Japonochytrium</i> sp.	15.33	15.23	15.24	14.76	14.95	18.22	18.22	0.24	4.51	0.08	10.62	10.52	0.00												
14 <i>Thraustochytrium aggregatum</i>	17.97	17.76	17.77	17.26	16.34	19.32	19.32	17.66	17.27	17.56	17.02	17.54	17.66	0.00											
15 <i>Thraustochytrium aureum</i>	12.98	13.37	13.18	13.00	13.09	14.74	14.74	10.90	9.04	10.71	8.21	8.94	10.61	14.72	0.00										
16 <i>Thraustochytrium kinnei</i>	22.73	22.84	22.84	22.41	21.86	22.47	22.47	19.52	19.52	19.31	17.76	18.48	19.42	22.10	15.32	0.00									
17 <i>Thraustochytrium pachydermum</i>	15.48	15.57	15.38	14.72	13.61	18.74	18.74	16.55	16.39	16.35	17.18	17.27	16.45	17.74	16.59	24.44	0.00								
18 <i>Thraustochytrium striatum</i>	13.64	13.15	13.34	13.37	13.07	16.45	16.45	10.90	10.72	10.71	9.60	9.87	10.81	15.54	7.85	16.64	15.85	0.00							
19 <i>Schizochytrium</i> sp.	21.40	21.29	21.19	22.26	21.00	20.85	20.85	17.52	17.35	17.32	16.17	16.47	17.42	22.47	15.68	19.34	23.22	17.81	0.00						
20 <i>Schizochytrium aggregatum</i>	22.13	22.03	21.69	22.55	21.18	22.40	22.40	18.12	17.97	17.91	16.77	17.07	18.02	22.77	16.07	20.41	24.31	18.11	2.55	0.00					
21 <i>Aurantiochytrium</i> sp.	18.89	18.57	18.47	19.05	18.21	18.46	18.46	16.81	16.65	16.71	16.41	16.81	16.82	19.75	14.41	23.16	19.73	15.53	17.97	19.02	0.00				
22 <i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	18.88	18.46	18.66	18.70	17.96	19.28	19.28	16.88	16.81	16.68	16.07	16.67	16.78	19.87	13.80	22.34	18.95	14.67	20.87	21.84	6.35	0.00			
23 <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	18.56	18.15	18.35	18.49	17.85	18.97	18.97	16.67	16.61	16.47	15.98	16.57	16.57	19.65	13.50	22.56	18.53	14.37	20.77	21.63	6.35	0.41	0.00		
24 <i>Parietichytrium sarkarium</i>	18.39	18.60	18.40	17.57	17.59	18.57	18.57	15.15	14.08	14.95	9.76	10.31	15.05	20.48	12.78	19.29	20.23	14.35	18.22	19.17	20.02	19.86	19.87	0.00	
25 <i>Parietichytrium</i> sp.	18.18	18.39	18.19	17.47	17.49	18.68	18.68	15.05	13.98	14.85	9.48	10.03	14.96	20.38	12.59	19.19	20.13	14.26	18.33	19.28	19.92	19.75	19.76	0.24	0.00

67

[illegible]

**Tabla 9. Divergencia de las secuencias del marcador 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies de los géneros *Aplanochytrium*, *Oblongichytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Ulkenia*, *Botryochytrium*, *Japonochytrium*, *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Parietichytrium* con secuencias de género no determinado**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 <i>Aplanochytrium kerguelense</i>	0.00																											
2 <i>Aplanochytrium minutum</i>	0.65	0.00																										
3 <i>Aplanochytrium stocchini</i>	0.57	0.00	0.00																									
4 <i>Oblongichytrium minutum</i>	5.58	5.76	5.58	0.00																								
5 <i>Oblongichytrium multirudimentale</i>	5.58	5.58	5.32	2.91	0.00																							
6 <i>Sicyoidochytrium minutum</i>	16.58	16.19	16.38	17.03	17.00	0.00																						
7 <i>Sicyoidochytrium</i> sp.	16.58	16.18	16.38	17.03	17.00	0.08	0.00																					
8 <i>Ulkenia amoeboides</i>	15.72	15.93	15.93	15.26	15.25	18.13	18.13	0.00																				
9 <i>Ulkenia profunda</i>	15.31	15.32	15.42	14.75	14.54	17.43	17.43	4.71	0.00																			
10 <i>Ulkenia visurgensis</i>	15.52	15.72	15.73	15.06	15.05	18.13	18.14	0.16	4.54	0.00																		
11 <i>Botryochytrium radiatum</i>	14.83	14.33	14.62	14.04	13.85	16.48	16.49	10.77	10.30	10.58	0.00																	
12 <i>Botryochytrium</i> sp.	15.02	14.53	14.82	14.34	14.14	16.89	16.90	10.68	10.30	10.49	0.65	0.00																
13 <i>Japonochytrium</i> sp.	15.62	15.83	15.83	15.06	15.16	18.24	18.24	0.24	4.63	0.08	10.68	10.58	0.00															
14 <i>Thraustochytrium aggregatum</i>	18.27	18.37	18.37	17.36	16.54	18.18	18.19	17.36	17.27	17.25	16.83	17.35	17.36	0.00														
15 <i>Thraustochytrium aureum</i>	13.63	13.83	13.63	13.36	13.26	14.93	14.93	10.97	9.28	10.78	8.17	8.90	10.68	14.31	0.00													
16 <i>Thraustochytrium kinnei</i>	22.10	21.99	21.99	21.14	20.91	21.62	21.63	19.02	19.11	18.81	17.36	18.08	18.92	21.71	14.72	0.00												
17 <i>Thraustochytrium pachydermum</i>	15.08	15.17	14.98	14.23	13.21	18.88	18.98	16.87	16.39	16.67	17.30	17.40	16.77	17.35	17.11	23.48	0.00											
18 <i>Thraustochytrium striatum</i>	14.01	13.81	14.01	13.54	13.34	16.66	16.67	10.97	10.88	10.78	9.47	9.74	10.88	15.23	8.08	16.13	15.94	0.00										
19 <i>Schizochytrium</i> sp.	21.32	21.31	21.20	21.75	20.40	20.58	20.69	16.91	16.83	16.70	15.47	15.77	16.81	21.72	15.17	19.27	22.50	17.42	0.00									
20 <i>Schizochytrium aggregatum</i>	22.17	22.17	21.84	22.27	21.11	21.79	21.90	17.72	17.45	17.51	16.28	16.58	17.62	21.91	15.46	19.58	23.83	17.60	2.65	0.00								
21 <i>Aurantiochytrium</i> sp.	19.22	18.90	18.80	19.09	18.34	18.35	18.35	17.41	16.61	17.30	16.30	16.59	17.41	19.87	14.18	22.63	19.44	15.82	18.40	19.45	0.00							
22 <i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	18.97	18.35	18.55	18.70	18.26	19.23	19.33	17.50	17.09	17.29	15.47	16.06	17.39	19.66	13.86	21.74	19.06	15.25	20.68	21.44	6.74	0.00						
23 <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	18.77	18.26	18.45	18.50	18.06	18.92	19.02	17.50	16.99	17.29	15.47	15.97	17.39	19.46	13.86	21.84	18.85	15.25	20.47	21.11	6.66	0.00	0.00					
24 <i>Parietichytrium sarkarium</i>	17.97	17.97	17.77	16.96	16.97	18.30	18.30	14.55	13.37	14.35	9.45	10.00	14.46	19.97	12.18	18.89	19.61	13.45	17.92	18.87	19.50	19.13	19.35	0.00				
25 <i>Parietichytrium</i> sp.	17.98	17.97	17.77	17.07	17.08	18.52	18.52	14.46	13.48	14.26	9.17	9.72	14.36	19.97	12.19	19.00	19.73	13.56	18.24	19.20	19.61	19.24	19.46	0.41	0.00			
26 510 512	19.64	19.52	19.42	19.39	18.64	18.67	18.66	17.51	16.60	17.41	15.98	16.49	17.52	19.64	14.18	22.53	19.65	15.92	18.31	19.23	0.98	6.47	6.20	19.70	19.82	0.00		
27 75	19.85	19.73	19.63	19.60	18.85	18.88	18.87	17.40	16.80	17.30	15.78	16.28	17.41	19.76	14.27	22.75	19.87	16.13	18.41	19.45	1.15	6.56	6.29	19.92	19.81	0.00	0.00	
28 C1	19.07	18.87	19.18	18.50	17.84	18.14	18.24	16.75	16.16	16.65	15.08	15.56	16.75	19.09	13.56	21.72	19.51	14.76	19.04	19.76	3.93	5.93	5.93	19.81	19.92	0.04	0.04	0.00

Tabla 10. Divergencia de las secuencias del gen 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies del género *Parietichytrium* con secuencias de los aislados del clado *Parietichytrium* (Figura 26 y 27)

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Parietichytrium sarkarianum</i>	0.00						
2 <i>Parietichytrium</i> sp. BAFCcult 3109	0.36	0.00					
3 307	0.64	0.46	0.00				
4 49	0.64	0.46	0.00	0.00			
5 120	0.18	0.18	0.64	0.64	0.00		
6 117	0.18	0.18	0.64	0.64	0.00	0.00	
7 118	0.18	0.18	0.64	0.64	0.00	0.00	0.00

Tabla 11. Divergencia de las secuencias del gen 18S rRNA (en porcentajes) entre las especies de los géneros *Ulkenia* y *Botryochytrium* con secuencias de los aislados del clado *Ulkenia* y *Botryochytrium* (Figura 26 y 27)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Ulkenia profunda</i>	0.00							
2 <i>Japonochytrium</i> sp. ATCC 28207	5.42	0.00						
3 543 545 546	5.03	0.55	0.00					
4 <i>Ulkenia visurgensis</i>	5.03	0.37	0.18	0.00				
5 <i>Ulkenia radiata</i>	12.14	13.24	13.02	12.80	0.00			
6 <i>Botryochytrium radiatum</i>	12.13	13.02	12.80	12.58	0.28	0.00		
7 <i>Botryochytrium</i> sp.	12.03	13.12	12.91	12.69	0.18	0.09	0.00	
8 541 542 544 548	12.03	13.12	12.91	12.69	0.28	0.18	0.09	0.00

## VI. DISCUSIÓN

### VI.1 Primer reporte de Thraustochitridos en los manglares de Tumbes

La presencia de thraustochitridos ha sido registrada a escala mundial y en diversos hábitats (Raghukumar, 2004), y los manglares de Tumbes no escapan de ello, observándose representantes en todos los puntos muestreados a pesar del cambio de salinidad en ciertos puntos (valores de 10 a 33‰, Tabla 1). Está reportado que el rango de tolerancia a la salinidad es variable según las especies, en general es amplio, y algunas cepas pueden prosperar a salinidades tan bajas como 2 g L<sup>-1</sup> (Burja *et al.*, 2006); pero los mejores valores de crecimiento se registran entre los niveles de 15 a 35 g L<sup>-1</sup> (Fan *et al.*, 2002), que corresponden al 50-100% de la concentración del agua de mar, lo cual corrobora a lo observado en este estudio donde el crecimiento óptimo de los aislados fue a una concentración del 70%. Además, se comprueba nuevamente que estos microorganismos se hallan asociados a material vegetal en descomposición, como son las hojas caídas del mangle. Probablemente estos microorganismos cumplan una importante función como saprobios, en virtud de su condición de heterótrofos absorptivos produciendo enzimas extracelulares (celulasas, amilasas y proteasas) (Raghukumar, 2002) y el método de epifluorescencia que utiliza acriflavina no solo ha permitido determinar su ocurrencia sino estimar su abundancia relativa, donde altas densidades de estos microorganismos se traduce en una alta tasa de remineralización de la materia orgánica (Raghukumar y Schaumann, 1993).

Con respecto a los ecosistemas muestreados en Latinoamérica, los únicos registros previos fueron gracias a los estudios de Ulken en los manglares de Brasil (1966 y 1983) y Costa Rica (Ulken *et al.*, 1990); Hinzpeter, en Puerto Montt, Chile (2008,



2009) quien determinó en la época de muestreo en esta zona costera, una salinidad y temperatura promedio del agua de un 30‰ y  $12,89 \pm 2,70$  ° C, respectivamente. De igual manera, Rosa (2010), determinó en los humedales de Argentina, valores de pH de 7.8, temperaturas oscilantes entre -2 a 23°C y valores de salinidad entre 23 y 36.5 ups. Estas condiciones no fueron similares a lo encontrado en los manglares de Tumbes, donde se registró una temperatura entre 25.4-28.6°C, un pH entre 7-8 y valores oscilantes de salinidad entre 10-33‰. Ante estas condiciones cambiantes, es probable que estos microorganismos hayan desarrollado mecanismos de adaptación sintetizando AG para contrarrestar las variables adversas sobre la fluidez de su membrana (Nichols *et al.*, 1993; 2002).

Estos reportes y el aportado por esta tesis suman una importante información acerca de la ocurrencia de estos microorganismos en sitios poco caracterizados, como son los estuarios templados o las lagunas salinas continentales.

## **VI.2 Caracterización molecular de Thraustochitridos de Tumbes**

Si bien las características de las colonias resultaron de suma utilidad para reconocer distintos tipos morfológicos de thraustochitridos durante la etapa inicial de aislamiento, es necesario considerar que los estudios en cultivo han demostrado que la caracterización morfológica de los aislamientos en estos protistas no es una tarea sencilla debido a las variaciones morfológicas que se observan, incluso entre individuos de un mismo cultivo (Kazama, 1974; Bongiorno *et al.*, 2005) y, resulta imprescindible la realización de otro tipo de estudio como es la caracterización molecular del gen 18S rRNA (Honda *et al.*, 1999; Leander *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003), que permite reducir el tiempo de selección de cepas y sobretodo definir criterios taxonómicos más seguros.

- **Sus relaciones evolutivas basadas en el marcador molecular 18S rRNA**

En la obtención del árbol filogenético, se utilizaron secuencias de thraustochitridos reportados en la base de datos. Al inicio del análisis era confuso el árbol generado con dichas secuencias. Esto es, debido a la asignación taxonómica equivocada que brindaron algunos investigadores en estudios iniciales con estos microorganismos y que el error aún persiste en la base de datos del GenBank. Por lo tanto, en los análisis posteriores se procedió a red denominar las secuencias con la asignación taxonómica correcta basándose en los trabajos de Yokohama y Honda (2007) y Yokohama y colaboradores (2007), en el cual se hace una red denominación de diferentes grupos de thraustochitridos.

Los árboles generados corroboran una vez más lo reportado previamente: las características morfológicas no revelan precisamente las relaciones evolutivas entre

thraustochitridos (Huang *et al.*, 2003). Un ejemplo, *Schizochytrium aggregatum* y *S. limacinum*, ambos exhiben divisiones binarias sucesivas de las células vegetativas, lo cual fue considerado criterio clave para la identificación del género *Schizochytrium* (Goldstein y Belsky, 1964; Moss, 1986). Sin embargo, el segundo fue redenido como *Aurantiochytrium limacinum* (basónimo: *S. limacinum*) y tanto *Schizochytrium aggregatum* como *A. limacinum* aparecen en grupos dispersos dentro del árbol filogenético (Figura 26 y 27). Así, con el estudio de Yokohama y Honda (2007) se hace una red denominación de éstos en los grupos *Shizochytrium sensu stricto* (incluye *S. agregatum*) y emergen los nuevos géneros *Aurantiochytrium* (basónimo: *S. limacinum* y *S. mangrovei*) y *Oblongichytrium* (basónimo: *S. minutum*).

Basándose en esta red denominación, la mayoría de nuestros aislados (alelos 1 al 49) forman parte del clado *Aurantiochytrium* (Tabla 6; Figura 26 y 27). Dentro de este grupo, los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527 (alelos 43 al 48) y C1 (alelo 49) forman un clado bien definido junto con la secuencia de *Aurantiochytrium* sp. 15A-14a y Thraustochytriidae sp. MBIC11087, formando el grupo hermano de la especie *Aurantiochytrium limacinum*.

Adicionalmente, se observó solo en estos aislados que forman parte de este clado *Aurantiochytrium*, un ruido en determinadas posiciones de su secuencia que fue constante solo entre estos aislados y no observándose en las demás cepas. Si bien la presencia de este ruido complicó la edición de la secuencia, posiblemente se trataría de que este género presenta un alto número de copias del 18S r RNA en su genoma (Nakazawa *et al.*, 2014) tal como se ha observado también en ciliados y dinoflagelados (Potvin y Love-joy, 2009) o bien es ocasionado por la presencia de microsatélites o de largos homopolímeros como los poliT que fueron reconocidos en

dichas regiones (Figura 22) (MacroGen Sequencing Trouble shooting guide, <https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/troubleshooting.jsp>).

Similarmente a lo anterior, Yokohama y colaboradores (2007) realizaron también un rearrreglo taxonómico para el género *Ulkenia*, éste fue recaracterizado y tres nuevos géneros establecidos: *Ulkenia sensu stricto*, *Sicyoidochytrium*, *Botryochytrium* y *Parietichytrium*.

En los árboles se puede identificar claramente a estos cuatro grupos: las cepas 541, 542, 544 y 548 forman parte del clado *Botryochytrium* (anteriormente identificadas como *U. radiata* y *U. profunda*), seguido se encuentra el clado *Ulkenia sensu stricto* que incluye a *U. visurgensis* y *U. profunda* donde se ubican los aislados 543, 545 y 546 y finalmente las cepas 49, 117, 118, 120 y 307 forman parte del clado *Parietichytrium* (Figura 26 y 27).

- **Diversidad de Thraustochitridos en los Manglares de Tumbes basadas en su divergencia genética**

Cuando se refiere a estudios de divergencia intra o interespecífica se estila utilizar secuencias de ADN mitocondrial (ADNm), el cual se caracteriza por revelar una alta tasa evolutiva y presentarse en gran número de copias por célula (Rand, 2001) si es comparado con el ADN nuclear, el cual está sometido a efectos homogenizadores. Así, el potencial de divergencia intraespecífica es mucho más alto en el ADNm (Barth *et. al.*, 2006), pero en este estudio, no es necesario tener una mejor resolución a este nivel bastando revelar notables diferencias entre los géneros. Así el conocimiento de variación genética en protistas es muy limitado (Barth *et. al.*, 2006), y para este grupo de thraustochitridos solo existe un reporte de Huang y

colaboradores (2003) quienes comparan secuencias de *S. limacinum* con secuencias de sus aislados.

Para tal caso se procedió a estimar las distancias genéticas entre cepas de thraustochitridos publicados en la base de datos. Con los resultados obtenidos, tanto en el análisis filogenético como en el análisis de la matriz de divergencia genética se demuestra claramente la diferencia entre géneros, lo que se ve reflejado sea ubicándose éstos en clados diferentes (Figura 26 y 27) u obteniendo valores altos de divergencia (Tabla 7-11), que fluctuaron entre un 8.21-24.44% entre géneros de thraustochitridos ya reportados (Tabla 7). Caso peculiar, es el género *Thraustochytrium*, donde la divergencia genética de sus diferentes especies osciló entre un 7.85 a 24.44% (Tabla 7), salvo esta excepción, la comparación de secuencias entre especies de un mismo género revelaron valores bajos que oscilaban entre un 0.16-6.35 % (Tabla 7).

Estos resultados son comparables con lo obtenido por Huang y colaboradores (2003), quienes encontraron valores de divergencia de un 2% y 20.1% cuando una cepa ubicada en el clado de *A. limacinum* es comparada con secuencias de *A. limacinum* y *S. aggregatum*, respectivamente, notándose una menor divergencia (2%) cuando son secuencias de la misma especie.

Con respecto a este estudio, en el clado *Aurantiochytrium* (Figura 26 y 27), la matriz resultante de distancias (Tabla 8) muestra valores que fluctuaron entre un 0-8.62% donde los valores más altos corresponden a cepas diferentes a la especie *A. limacinum*. Éstas corresponden a los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527, C1 (sombreado en plomo) y, así como lo muestra el análisis filogenético (Figura 26 y

27), éstos divergen del grupo de *A. limacinum* entre un 6.85-7.57%, donde los valores más altos corresponden a los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526 y 527, ya que el aislado C1 presentó una divergencia de entre 6.85-6.95% con *A. limacinum* y de un 3.74-3.83% con los aislados antes mencionados. Este resultado también es reflejado en el análisis filogenético (Figura 26 y 27) donde estas cepas se encontraban formando un clado diferente al grupo *A. limacinum*, soportado por valores de *bootstrap* confiables, posiblemente tratándose de dos nuevas especies de este género. Esta afirmación se corrobora nuevamente con los resultados mostrados en la Tabla 9, donde estos aislados presentan una divergencia entre un 5.93- 6.29% con la especie *A. limacinum* y entre un 0.98-3.93% con *Aurantiochytrium* sp. 15A-14a (*Genbank Accesion* N° AB811008).

Estos resultados estarían indicando que pertenecerían a especies diferentes, lo que estaría corroborado con características morfológicas observadas en medio de cultivo, donde los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527 tuvieron un crecimiento lento, de aspecto grumoso en medio líquido y coloración naranja en su cultivo celular; características que fueron contrastantes a lo observado en aislados de la especie *A. limacinum*, cuyo crecimiento fue rápido y de color crema (Honda *et al.*, 1998). Estudios de producción de escualeno en thraustochitridos, determinaron que esta cepa de referencia, *Aurantiochytrium* sp. 15A-14a (*Genbank Accesion* N° AB811008), presentaba una óptima producción de escualeno y el cual está relacionado con el color naranja de las colonias (Nakazawa *et al.*, 2014), esto último fue una característica observada en los aislados 75, 507, 510, 512, 523, 526 y 527.

Por otro lado, al analizar más al aislado C1 el cual tuvo un mejor *hit* con Thraustochytriidae sp. T65 (*Genbank Accesion* N° DQ836629.1)(Jakobsen *et al.*,

2007) en un 98% de identidad (Tabla 6), se ha reportado que en esta cepa así como en *Schizochytrium* sp. S8 (*Genbank Accesion* N° DQ836630), producen *de novo* el (-)-proto-quercitol y la glicina-betaína, considerados ambos como una habilidad de protección ante muchas condiciones adversas como son la temperatura, salinidad, *stress* por alta osmolaridad externa (Jakobsen *et al.*, 2007). Estudios adicionales de caracterización lipídica podrían reforzar la hipótesis de que las cepas 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527 y C1 constituyen linajes independientes a *A. limacinum*, donde su respectivo perfil lipídico permitiría agrupar a estos microorganismos con una aproximación muy cercana a la que se obtiene en términos de su secuencia 18S rRNA (Huang *et al.*, 2003).

Con respecto al clado *Parietichytrium*, los valores de divergencia observados fluctuaron entre un 0-0.64% entre los aislados 49, 117, 118, 120 y 307 con secuencias reportadas de la especie *Parietichytrium sarkarianum* (Tabla 10), confirmando el resultado observado en el análisis filogenético (Figura 26 y 27).

Con respecto al clado *Botryochytrium*, los valores de divergencia observados fluctuaron entre un 0.09-0.28% entre los aislados 541, 542, 544 y 548 con secuencias reportadas de *Botryochytrium* spp. y *Ulkenia radiata* (Tabla 11), confirmando el resultado observado en el análisis filogenético (Figura 26 y 27). Finalmente, en el clado *Ulkenia sensu stricto*, los valores de divergencia observados fluctuaron en un 0.55% entre los aislados 543, 545 y 546 con *Japonochytrium* sp. y en un 0.18% con *Ulkenia visurgensis*, tratándose posiblemente de aislados de ésta última especie.

Esta tesis buscó dar un aporte más al conocimiento de nuestra biodiversidad al mundo, reportando los primeros aislamientos de thraustochitridos en nuestro país, en los manglares de Tumbes, donde las condiciones tanto de pH (valores de 7 a 8) como los valores fluctuantes de salinidad (10-33‰) fueron propicios para su ocurrencia. Por otro lado, la caracterización molecular de estos microorganismos permitió no solo la identificación de nuevas especies sino también de potenciales aislados productores de AGPIs con posibles aplicaciones biotecnológicas como son las cepas 75, 507, 510, 512, 523, 526, 527, C1 y, que en esta tesis, solo se ha demostrado su capacidad de sintetizar ácidos grasos con la tinción rojo de nilo que resultó positiva. La información proporcionada por esta tesis constituye punto de partida para realizar estudios posteriores de microorganismos altamente productores de AGPIs, como son los thraustochitridos, lo que permitirá a nuestro país incursionar en la faceta biotecnológica.



## VII. CONCLUSIONES

- Las metodologías empleadas en el estudio (hoja senescente y granos de polen) permitieron aislar con éxito las 268 colonias de thraustochitridos en medios de cultivo básicos, donde la caracterización morfológica preliminar (observaciones de los rasgos de las colonias en medio sólido) resultaron útiles para mostrar que los aislamientos constituyen cepas individuales representantes de al menos gran parte de la biodiversidad de thraustochitridos de los manglares de Tumbes.
- En la identificación bioquímica, luego de confirmar la identidad de estos microorganismos con acriflavina, la presencia de lípidos con rojo de nilo fue determinante para la continuación del estudio con este microorganismo.
- Los Manglares de Tumbes no escapan a la presencia de estos microorganismos thraustochitridos y basado en los análisis filogenéticos, los aislados se encontraron ubicados en clados de importantes géneros como *Aurantiochytrium* (basónimo: *Shizochytrium*), *Parietichytrium*, *Botryochytrium* e *Ulkenia sensu stricto*.
- Los resultados de divergencia genética lograron corroborar los resultados obtenidos en el análisis filogenético, proponiendo el posible descubrimiento de dos nuevas especies con potenciales biotecnológicos en base a los resultados.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Es necesario considerar que los estudios en cultivo han mostrado que la caracterización morfológica de los aislamientos no es una tarea sencilla resultando imprescindible la realización de otro tipo de estudios que complementen la información actualmente disponible para la identificación de estos organismos y que permitan definir criterios taxonómicos más seguros como es la caracterización molecular utilizando el gen 18S rRNA.
- Con la caracterización no sólo bioquímica y molecular sino complementarlo con estudios de perfil lipídico, de caracterización de pigmentos, etc. permitirá identificar nuevos aislados con gran potencial biotecnológico como parecen ser las dos nuevas especies identificadas en el presente estudio y, se propone seguir con la investigación y valorización de estos microorganismos altamente productores de AGPIs, lo que permitirá a nuestro país incursionar en una faceta biotecnológica así como constituir un aporte más al conocimiento de nuestra biodiversidad al mundo.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S. M.; LEANDER, B. S.; SIMPSON, A. G. B.; *et. al.* 2007. Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Systematic Biology* 56(4): 684-689.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS, E.W. y LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 5(3):403-410.
- ANDERSON, O. R. y CAVALIER-SMITH, T. 2012. Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a New Small Freshwater Species, and a Revised Analysis of *Labyrinthulea* (Heterokonta). *Acta Protozoologica* 51(4): 291-304.
- BAHNWEG, G. y SPARROW, F.K. 1974. Four new species of *Thraustochytrium* from Antarctic regions, with notes on the distribution of zoosporic fungi in the Antarctic marine ecosystems. *American Journal of Botany* 61(7):754-766.
- BAHNWEG, G. y SPARROW, F. K. 1972. *Aphanochytrium kergeulensis* gen nov. spec. nov., a new phycomycete from subarctic marine waters. *Archiv Fur Mikrobiologie* 81(1):45-49
- BARBOSA, M.J.G.V. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimization. Tesis para optar grado PhD, Universidad de Wageningen, Wageningen. 2003.
- BARTH, D.; KRENEK, S.; FOKIN, S.I. y BERENDONK, T.U. 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome C oxidase I sequences. *The Journal of eukaryotic microbiology* 53(1):20-25.
- BELARBI, E.H.; MOLINA E. y CHISTI, Y. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and microbial technology* 26(7):526-529.
- BONGIORNI, L.; JAIN, R.; RAGHUKUMAR, S. y AGGARWAL, R.K. 2005. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a New *Thraustochytrid* Stramenopilan Protist from Mangroves of Goa, India. *Protist* 156 (3):303-315.

- BOOTH, T. 1971. Occurrence and distribution of some zoosporic fungi from soils of Hibben and Moresby Islands, Queen Charlotte Islands. Canadian Journal of Botany 49 (6):951-965.
- BOOTH, T. y MILLER, C.E. 1968. Comparative morphological and taxonomic studies in the genus *Thraustochytrium*. Mycologia. 60(3):480-496.
- BOWER, S. M. 1987. *Labyrinthuloides haliotidis* n.sp. (Protozoa: Labyrinthomorpha), a pathogenic parasite of small juvenile abalone in a British Columbia mariculture facility. Canadian Journal of Zoology 65 (8):1996-2007.
- BOWLES, R. D.; HUNT, A. E.; BREMER, G. B.; DUCHARS, M.G. y EATON, R.A. 1999. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening the isolates and optimization of DHA production. Journal of Biotechnology 70 (1-3):193-202.
- BRAVO, J. y WINDEVORHEL, N. 1997. Manual para la identificación y clasificación de humedales en Costa Rica. San José, Costa Rica: UICN/ORMA, MINAE, Embajada Real de los Países Bajos.
- BURJA, A.M.; RADIANTINGTYAS, H.; WINDUST, A. y BARROW, C.J. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. Applied Microbiology and Biotechnology 72 (6):1161-1169.
- CADDY, J. F. y GARIBALDI, L. 2000. Apparent changes in the trophic composition of world marine harvests: the perspective from the FAO capture database. Ocean & Coastal Management 43 (8):611-655.
- CASTRESANA J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Molecular biology and evolution 17(4):540-542.
- CAVALIER-SMITH, T. y CHAO, E. E-Y. 2006. Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (Kingdom Chromista). Journal of Molecular Evolution 62 (4):388-420.

- CAVALIER-SMITH, T. 1997. Sagenista and Bigyra, two phyla of heterotrophic heterokont chromists. *Archiv fuer protistenkunde* 148 (3):253–267.
- CAVALIER-SMITH, T.; ALLSOPP, M.T.E.P. y CHAO, E.E. 1994. Thraustochytrids are chromists, not fungi: 18S rRNA signatures of Heterokonta. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 346 (1318):387–397.
- CAVALIER-SMITH, T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews* 57(4):953-94.
- CAVALIER-SMITH, T. 1986. The kingdom Chromista: origin and systematics. In: *Progress in Phycological Research*, Vol. 4, (Eds. F. E. Round, D. J. Chapman). Bristol, Biopress pp. 309–347.
- CHAMBERLAIN, A. y MOSS, S. 1988. The thraustochytrids: a protist group with mixed affinities. *Biosystems* 21(3-4):341- 349.
- CHARCAPE-RAVELO, M. y MOUTARDE, F. 2005. Diversidad florística y conservación del Santuario Regional de Piura Manglares San Pedro de Vice-Sechura. *Revista Peruana de Biología* 12 (2):327-334.
- CHANG, K.J.; MANSOUR, M.P.; DUNSTAN, G.A.; BLACKBURN, S.I.; KOUTOULIS, A. y NICHOLS, P.D. 2011. Odd-chain polyunsaturated fatty acids in thraustochytrids. *Phytochemistry* 72 (11-12):1460-1465.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R. y POSADA, D. 2002. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8):772.
- DICK, M.W. 2001. *Straminipilous Fungi*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ELLIS, L.L. y BISHOP, S.H. 1989. Isolation of cell lines with limited growth potential from marine bivalves, En: Mitsunashi J (Ed), *Invertebrate Cell Culture Applications*. CRC Press, Florida, p. 243–251.

- FAN, K-W y CHEN, F. 2007. Production of high-value products by marine microalgae thraustochytrids. En: Yang, Shang-Tian (edit.). Bioprocessing for value added products from renewable resources. Amsterdam. Elsevier, p. 293-324.
- FAN, K.W.; VRIJMOED, L.L.P. y JONES, E.B.G. 2002. Physiological Studies of Subtropical Mangrove Thraustochytrids. *Botanica Marina* 45 (1):50–57.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4):783-791.
- FULLER, M.S; FOWLES, B.E. y MCLAUGHLIN, D.J. 1964. Isolation and pure culture study of marine phycomycetes. *Mycologia* 56 (5):745-756.
- GAERTNER, A. 1981. A new marine phycomycete, *Schizochytrium minutum*, sp. nov. (Thraustochytriaceae) from Saline Habitats. *Veröff Inst Meeresforsch Bremerh* 19:61-69.
- GILL, I y VALIVETY, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends in biotechnology* 15 (10):401-409.
- GOLDSTEIN, S. y BELSKY, M. 1964. Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. *American Journal of Botany* 51 (1):72-78.
- GOLDSTEIN, S. 1963. Studies of a new species of *Thraustochytrium* that displays light stimulated growth. *Mycologia* 55 (6):799-811.
- GUPTA, A.; BARROW, C. y PURI, M. 2012. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnology Advances* 30 (6):1733-45.
- HAREL, M.; BEN-DOV, E.; RASOULOUNIRIANA, D.; SIBONI, N.; KRAMARSKY-WINTER, E.; LOYA, Y.; BARAK, Z.; WIESMAN, Z. y KUSHMARO, A. 2008. A new Thraustochytrid, strain *Fng1*, isolated from the surface mucus of the hermatypic coral *Fungia granulosa*. *FEMS Microbiology Ecology* 64 (3):378–387.

- HAYTHORN, J.M.; GARETH JONES, E.B. y HARRISON, J.L. 1980. Observations on marine algicolous fungi, including the hyphomycete *Sigmoidea marina* sp.nov. Transactions of the British Mycological Society 74 (3):615-623.
- HINZPETER, I.; QUILODRÁN, B.; STEAD, R.; TRUJILLO, L.; VIDAL, J. y SHENE, C. 2009. Aislamiento de cepas de traustochytrids en la zona costera de Puerto Montt, Chile y evaluación de la producción de ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA). *Afinidad* 66 (544):482-487.
- HINZPETER, I. 2008. Identificación de microorganismos del orden Thraustochytriales provenientes de la zona costera de Puerto Montt, Chile y determinación de la capacidad de producción de ácido docosahexaenoico. Tesis para optar al grado de Doctor, Universidad de la frontera, Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración, Chile.
- HONDA, D.; YOKOCHI, T.; NAKAHARA, T.; RAGHUKUMAR, S.; NAKAGIRI, A.; SCHAUMANN, K. y HIGASHIHARA, T. 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18s ribosomal RNA gene. *The Journal of eukaryotic microbiology* 46 (6):637-647.
- HONDA, D.; YOKOCHI, T.; NAKAHARA, T.; ERATA, M. y HIGASHIHARA, T. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycological Research* 102 (4):439-448.
- HONG, W-K; RAIRAKHWADA, D.; SEO, P-S.; PARK, S-Y.; HUR, B-K.; KIM, C.; *et al.* 2011. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164 (8):468-480.
- HUANG, J.; AKI, T.; YOKOCHI, T.; NAKAHARA, T.; HONDA, D.; KAWAMOTO, S.; SHIGETA, S.; ONO, K. y SUZUKI, O. 2003. Grouping Newly Isolated Docosahexaenoic Acid-Producing Thraustochytrids Based on Their Polyunsaturated Fatty Acid Profiles and Comparative Analysis of 18S rRNA Genes. *Marine Biotechnology* 5 (5):450-457.

- HUELSENBECK, J.P. y RONQUIST, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8):754-755.
- INRENA. 2007-2011. Plan Maestro del Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes. Lima. 197 páginas.
- IWAMOTO, H. y SATO, G. 1986. Production of EPA by freshwater unicellular algae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 63:434-438.
- JAKOBSEN, A.N.; AASEN, I.M. y STROM, A.R. 2007. Endogenously synthesized (-)-proto-quercitol and glycine betaine are principal compatible solutes of *Schizochytrium* sp. strain S8 (ATCC 20889) and three new isolates of phylogenetically related thraustochytrids. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (18):5848–5856.
- JONES, E.B.G. 1976. Physiology of marine Phycomycetes, En: E.B.G. J (Ed), *Recent Advances in Aquatic Mycology*. Elek Science. London, pp. 261-278.
- KAZAMA, F. 1974. Ultrastructure of Thraustochytrium sp. zoospores. IV. External morphology with notes on the zoospores of Schizochytrium sp. *Mycologia* 66 (2): 272-80.
- KAZAMA, F. 1972. Ultrastructure of Thraustochytrium sp. zoospores. *Archiv fur Mikrobiology* 83 (3):179-88.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16 (2):111-120.
- KIRK. P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C. y STALPERS, J.A. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9na ed. CABI Publishing, Wallingford.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.;



THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J. y HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21):2947-2948.

- LEANDER, C.A.; PORTER, D. y LEANDER, B. 2004. Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *European Journal of Protistology* 40 (4):317-328.
- LEANDER, C.A. y PORTER, D. 2001. The Labyrinthulomycota is comprised of three distinct lineages. *Mycologia* 93 (3):459–464.
- LEE, K.W. y LIP, G. Y. H. 2003. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *Quarterly journal of medicine* 96 (7):465-480.
- LEIPE, D.D.; WAINRIGHT, P.O.; GUNDERSON, J.H.; PORTER, D.; PATTERSON, D.J.; VALOIS, F.; HIMMERICH, S. y SOGIN, M. L. 1994. The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* 33 (5):369-377.
- LEWIS, T.; NICHOLS, P. y McMEEKIN, T. 1999. The Biotechnological Potential of Thraustochytrids. *Marine Biotechnology* 1 (6):580-587.
- LIBRADO, P. y ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11):1451-1452
- LIPPMEIER, J.C.; CRAWFORD, K.S.; OWEN, C.B.; RIVAS, A.A.; METZ, J.G. y APT, K.E. 2009. Characterization of Both Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthetic Pathways in *Schizochytrium sp.* *Lipids* 44 (7):621-630.
- MAAS, P.A.Y.; KLEINSCHUSTER, S.J.; DYKSTRA, M.J.; SMOLOWITZ, R. y PARENT, J. 1999. Molecular characterization of QPX (quahog parasite unknown), a pathogen of *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Shellfish Research* 18 (2):561-567.

- MAROTEAUX, L.; HERZOG, M. y SOYER-GOBILLARD, M.O. 1985. Molecular organization of dinoflagellate ribosomal DNA: evolutionary implications of the deduced 5.8 S rRNA secondary structure. *Biosystems* 18 (3-4):307-319.
- MASSON, S.; LATINI, R.; TACCONI, M. y BERNASCONI, R. 2007. Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies. *Journal of Cardiovascular Medicine* 8 (Suppl 1):S4-S10.
- MATAIX, J. 2002. Los ácidos grasos omega-3. *Mundo científico* 235: 46-53.
- MATAIX, J. y SANCHEZ DE MEDINA, F. Lípidos. En MATAIX, José (edit.). *Nutrición y Alimentación humana (Nutrientes y alimentos)*. Ergón 2002, p. 63-93, ISBN 8484730883, 9788484730880.
- MEDINA, A.; GRIMA, E. M.; GIMENEZ, A. G. y GONZALEZ, M. J. 1998. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances* 16 (3):517-580.
- METZ, J. 2010. Schizochytrium fatty acid synthase (FAS) and products and methods related thereto. En: *Application USP*, editor.
- MILLER, J.D. y JONES, E.B.G. 1983. Observations on the association of thraustochytrid marine fungi with decaying seaweed. *Botanica Marina* 26 (7):345-351.
- MO, C.; DOUEK, J. y RINKEVICH, B. 2002. Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S rDNA sequence. *Marine Biology* 140 (5):883-889.
- MOSS, S.T. 1986. Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales. In: *The Biology of Marine Fungi*, Moss, S.T. (ed). New York, N.Y.: Cambridge University Press, p. 105–129.
- NAGANUMA, T.; TAKASUGI, H. y KIRNURA, H. 1998. Abundance of thraustochytrids in costal plankton. *Marine Ecology Progress Series* 162:105-110.

- NAGEL, G.; NIETERS, A.; BECKER, N. y LINSEISEN, J. 2003. The influence of the dietary intake of fatty acids and antioxidants on hay fever in adults. *Allergy* 58 (12):1277–1284.
- NAKAZAWA, A.; KOKUBUN, Y.; MATSUURA, H.; YONEZAWA, N.; KOSE, R.; YOSHIDA, M.; TANABE, Y.; KUSUDA, E.; *et al.* 2014. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *Journal of Applied Phycology* 26 (1):29-41.
- NICHOLS, D. S. y McMEEKIN, T. A. 2002. Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. *Journal of Microbiological Methods* 48 (2-3):161-70.
- NICHOLS, D.S.; NICHOLS, P.D. y MCMEEKIN, T.A. 1993. Polyunsaturated fatty acids in antarctic bacteria. *Antarctic Science* 5 (2):149-160.
- OLIVE, L. S. 1975. *The Mycetozoa*. Academic Press, New York.
- PERVEEN, Z.; ANDO, H.; UENO, A.; ITO, Y.; YAMAMOTO, Y.; YAMADA, Y.; TAKAGI, T.; KANEKO, T.; KOGAME, K.; OKUYAMA, H. 2006. Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology Letters* 28 (3):197- 202.
- PORTER, D. 1990. Phylum Labyrinthulomycota, En: MARGULIS, L; CORLINS, JO; MELKONIAN, M and CHAPMAN J (Edit.). *Handbook of Protoctista*. Boston, MA. Jones and Barlett Publishers, pp. 338-398.
- POSADA, D. y BUCKLEY, T.R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic biology* 53 ( 5):793-808.
- POTVIN, M. y LOVEJOY, C. 2009. PCR-based diversity estimates of artificial and environmental 18S rRNA gene libraries. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56 (2):174–181.

- QUILODRÁN, B.; HINZPETER, I.; HORMAZABAL, E.; QUIROZ, A. y SHENE C. 2010. Docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) and astaxanthin production by *Thraustochytriidae* sp. AS4-A1 a native strain with high similitude to *Ulkenia* sp.: Evaluation of liquid residues from food industry as nutrient sources. *Enzyme and Microbial Technology* 47 (1-2):24-30.
- RAGHUKUMAR, S. 2004. The Role of Fungi in Marine Detrital Processes. En: RAMAIAH, N. (edit.). *Marine Microbiology: Facets & Opportunities*. Goa, India. National Institute of Oceanography, p. 91-101.
- RAGHUKUMAR, S. 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (*Thraustochytrids* and *labyrinthulids*). *European Journal Protistology* 38 (2):127-145.
- RAGHUKUMAR, S.; ANIL, A. C.; KHANDEPARKER, L. y PATIL, J.S. 2000. *Thraustochytrids* protists as a component of marine microbial films. *Marine Biology* 136 (4):603-609.
- RAGHUKUMAR, S. y SCHAUMANN, K. 1993. An epifluorescence microscopy method for direct detection and enumeration of the fungi like marine protists, the *thraustochytrids*. *Limnology & Oceanography* 38 (1):182-187.
- RAGHUKUMAR, S. 1988a. *Schizochytrium octosporum* sp. nov. and other *thraustochytrids* from the North Sea (Rosfjord, Norway). *Transactions of the British Mycological Society* 90 (2):273-278.
- RAGHUKUMAR, S. 1988b. *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a *thraustochytrid* from mangroves in India. *Transactions of the British Mycological Society* 90 (4):627-631.
- RAGHUKUMAR, S. 1979. Observations of the life cycle and movement of the *Thraustochytrid* *Ulkenia amoeboides* (Bahnweg & Sparrow) from the North Sea. *Journal of Protozoology* 26 (4):564-566.

- RAMBAUT, A. FigTree versión 1.4. Reino Unido, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh 2006-2012. Disponible en web <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- RAMSAR. 1990. Proceeding of the third Meeting of the conference of the contracting parties, Gland, Suiza: Ramsar Convention Bureau, UICN.
- RAND, D. M. 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 32 (1):415–448.
- RATLEDGE, C. 2005. Single Cell Oils for the 21st Century. In Cohen & Ratledge Eds. *Single Cell Oil*. AOCS PRESS, p. 1-20.
- RATLEDGE, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86 (11):807-815.
- RATLEDGE, C. y WYNN, J.P. 2001. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*.51:1–51.
- REDDY, R. D. y YAO, J. K. 2003. Environmental factors and membrane polyunsaturated fatty acids in schizophrenia. Prostaglandins, leukotrienes, and medicine 69 (6):385-391.
- ROSA, S. 2010. Las thraustochytriales (labyrinthulomycetes, heterokonta): caracterización de su biodiversidad en humedales salinos de la Argentina mediante un enfoque multidisciplinario y diseño de un bioproceso para la producción de ácidos grasos omega 3. Tesis para optar al título de Doctor, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina.
- ROSA, S. M.; GALVAGNO, M. A. y VÉLEZ, C. G. 2006. Primeros aislamientos de thraustochytriales (labyrinthulomycetes, heterokonta) de ambientes estuariales y salinos de la argentina. *Darwiniana* 44 (1):81-88.

- ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. C.; DUPERTUIS, Y. M. y PICHARD, C. 2004. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical nutrition* 23 (2):138-151.
- RUIZ-LÓPEZ, N.; SAYANOVA, O.; NAPIER, J. y HASLAM, R. 2012. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 63 (7):2397-410.
- RUSSEL, N.J. y NICHOLS, D.S. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiology* 145 (4):767-779.
- RUSSO, G. L. 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology* 77 (6):937-46.
- SAGLIK, S. y IMRE, S. 2001.  $\omega$ 3-fatty acids in some fish species from Turkey. *Journal of Food Science* 66 (2):210-212.
- SEO, T.; BLANER, W. S. y DECKELBAUM, R. J. 2005. Omega-3 fatty acids: molecular approaches to optimal biological outcomes. *Current Opinion in Lipidology* 16 (1):11-18.
- SIBONI, N.; RASOULOUNIRIANA, D.; BEN-DOV, E.; KRAMARSKY-WINTER, E.; SIVAN, A.; LOYA, Y.; HOEGH-GULDBERG, O. y KUSHMARO, A. 2010. Stramenopile Microorganisms Associated with the Massive Coral *Favia* sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57 (3):236-244.
- SPARROW, F.K. 1960. *Aquatic Phycomycetes*, Ann Arbor, 2da ed. Univ. Michigan Press, Michigan.
- SWOFFORD, D.L. 1998. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. y KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12):2725-2729.
- TAOCA, Y.; NAGANO, N.; OKITA, Y.; IZUMIDA, H.; SUGIMOTO, S. y HAYASHI, M. 2010. Use of an antifungal drug, Amphotericin B for isolation of thraustochytrids. *Journal of bioscience and bioengineering* 110 (6):720–723.
- TSUI, K.M.; MARSHALL, W.; BERBEE, M.L.; YOKOYAMA, R. y HONDA, D. 2009. Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50 (1):129–140.
- ULKEN, A. 1990. Marine thraustochytrids and chytridiomycetes in the North Sea area and in selected other regions. Berlin. J. Cramer, 1990, 93 p. ISBN 978-3-443-59038-3.
- ULKEN, A. 1983. Distribution of Phycomycetes in mangrove swamps with brackish waters and waters of high salinity. En: TEAS, H.J. (edit). *Biology and Ecology of Mangroves*. Springer, p. 111-116.
- ULKEN, A. 1981. On the role of phycomycetes in the food web of different mangrove swamps with brackish waters and waters of high salinity. *Kieler Meeresforsch Sonderh* 5:425–428
- ULKEN, A. 1966. Untersuchugen über marine Pilze im äquatorialen Atlantik vor der Küste Brasiliens. *Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven* 10 (2):107-116.
- VISHNIAC, H. 1960. Salt requirements of marine phycomycetes. *Limnology and Oceanography* 5 (4):362-365.
- VISHNIAC, H.S. 1956. On the ecology of the lower marine fungi. *The Biological Bulletin* 111 (3):410-414.

- VISHNIAC, H.S. 1955. The nutritional requirements of isolates of *Labyrinthula* spp. *Journal of general microbiology* 12 (3):455-463.
- VISHNIAC, H.S. y WATSON, S.W. 1953. The steroid requirements of *Labyrinthula vitellina* var. *pacifica*. *Journal of general microbiology* 8 (2):248-255.
- WARD, O.P. y SINGH, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* 40 (12):3627-3652.
- WATSON, S.W. y ORDAL, E. J. 1957. Techniques for the isolation of *Labyrinthula* and *Thraustochytrium* in pure culture. *Journal of Bacteriology* 73 (4):589-590.
- WHYTE, S.K.; CAWTHORN, S.E. y McGLADDERY, S.E. 1994. QPX (Quahaug Parasite X), a pathogen of northern quahaug *Mercenaria mercenaria* from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Diseases of aquatic organisms* 19:129-136.
- WILKENS, S.L. y MAAS, E.W. 2012. Development of a novel technique for axenic isolation and culture of thraustochytrids from New Zealand marine environments. *Journal of applied microbiology* 112 (2):346–352.
- YOKOCHI, T.; HONDA, D.; HIGASSHIHARA, T. y NAKAHARA, T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (1):72-76.
- YOKOYAMA, R. y HONDA, D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48 (4):199-211.
- YOKOYAMA, R.; SALLEH, B. y HONDA, D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48 (6):329-341.